



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA VITAMINA D EN LA FAGOCITOSIS DE *Mycobacterium tuberculosis* Y EN LA EXPRESIÓN DE GENES EN MONOCITOS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MITZI GARCÍA OLIVARES



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA TERESA HERRERA BARRIOS

Cd. Universitaria, D. F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	García
Apellido materno	Olivares
Nombre(s)	Mitzi
Teléfono	55 48 21 26
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta☒	307128607
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dra.
Nombre(s)	María Teresa
Apellido paterno	Herrera
Apellido materno☒	Barrios
3. Datos del sinodal 1	3. Datos sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Clara Inés
Apellido paterno	Espitia
Apellido materno	Pinzón
4. Datos del sinodal 2	4. Datos sinodal 2
Grado	Dr.
Nombre(s)	Sigifredo
Apellido paterno	Pedraza
Apellido materno	Sánchez
5. Datos del sinodal 3	5. Datos sinodal 3
Grado	Dra.
Nombre(s)	Yolanda
Apellido paterno	González
Apellido materno	Hernández
6. Datos del sinodal 4	6. Datos sinodal 4
Grado	Dra.
Nombre(s)	Silvia
Apellido paterno	Guzmán
Apellido materno	Beltrán
7. Datos del trabajo escrito.	7. Datos del trabajo escrito
Título	Efecto de la vitamina D en la fagocitosis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y en la expresión de genes en monocitos humanos
Número de páginas	46 p.
Año☒	2014

Agradecimientos

Gracias a Dios por darme una gran familia y amigos, así como la fuerza para la realización de este trabajo.

Mi infinita gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque es un orgullo pertenecer a esta gran institución y ser parte de su excelencia académica.

A mis maestros de la Facultad de Ciencias que contribuyeron a la formación de mis conocimientos.

Gracias a ti mamá porque siempre has estado junto a mí, apoyándome en este camino de estudiante. Gracias por esas desveladas, preocupaciones, enseñanzas y sobre todo cariño, que me has brindado a lo largo de esta vida.

Gracias a ti papá por tenerme toda la paciencia y la confianza del mundo para que terminara este proyecto en mi vida. Por los valores y enseñanzas inculcados que me motivaban a continuar en mi vida académica y personal.

A ti hermana por todas esas historias que me contabas durante la escritura de mi trabajo que me hacían más amenas la noches. Gracias por escucharme y darme grandes consejos de vida.

A mis tíos es especial a Inés y René que durante los momentos buenos y malos siempre estuvieron apoyándonos. Muchas gracias por esos momentos tan divertidos que vivimos y viviremos en familia.

A mis amigos de Ciencias (Karla, Ivonne y Kevin) por escucharme y apoyarme en todo momento. Sus consejos, apoyos, aventuras y risas, que vivimos juntos, contribuyeron a mi formación académica y personal. Los llevaré en el corazón por siempre.

Agradezco infinitamente a la Dra. María Teresa Herrera Barrios por su apoyo en la dirección y realización de esta tesis, por darme la oportunidad de trabajar con ella y de compartirme sus conocimientos y sobre todo su tiempo. Por su paciencia y dedicación gracias.

Este proyecto de investigación se realizó en el departamento de investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y recibió el financiamiento de CONACYT: CB2008-101948-M

ÍNDICE

	Página
1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	4
3.1 Susceptibilidad a tuberculosis.....	4
3.2 El sistema inmune.....	5
3.3 Monocitos.....	5
3.3.1. Reconocimiento de los monocitos.....	6
3.4 Fagocitosis y reconocimiento.....	5
3.5 Vitamina D.....	8
3.5.1 La Vitamina D y la fagocitosis.....	9
3.5.2 Insuficiencias de Vitamina D.....	10
3.7. Receptor de vitamina D.....	11
3.6. Catelicidina.....	11
3.7. TACO (tryptophan aspartate containing coat protein).....	14
4. Justificación	16
5. Hipótesis	16
6. Objetivos	17
7. Material y Métodos	18
7.1 Grupo de Estudio.....	18

7.2. Separación de células mononucleares de da sangre periférica.....	18
7.3. Separación de monocitos.....	18
7.4. Evaluación de pureza de monocitos.....	18
7.5. Descongelamiento y disgregación de la cepa H37Ra de <i>M. tuberculosis</i>	20
7.6. Evaluación de la fagocitosis.....	20
7.7. Evaluación de la fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i> por monocitos pre-tratados con vitamina D.....	20
7.8 Tinción de <i>M. tuberculosis</i> por el método Kenyou.....	21
7.9. Tratamiento de MN con la vitamina D sobre la expresión de genes.....	21
7.10. Extracción de RNA total por columna.....	21
7.11. Síntesis de DNA complementario.....	22
7.12. Análisis de expresión de genes por PCR en tiempo real.....	22
7.13. Análisis estadístico.....	23
8. Resultados.....	24
9. Discusión.....	35
10. Conclusión.....	39
11. Perspectivas.....	39
12. Anexos.....	44

1. ABREVIATURAS

CYP27B1=por sus siglas en inglés cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1

DM2= Diabetes Mellitus tipo 2

LL-37= Catelicidina (por sus siglas en inglés Catelicidin LL-37)

MN=Monocitos

MOI= Multiplicidad de infección (por sus siglas en inglés Multiplicity of infection)

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés Polimerase chain reaction)

PBMC= Células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés Peripheral blood mononuclear cells)

RXR= Receptor se ácido retinoico (por sus siglas en inglés Retinoic acid receptor)

TACO= Proteína de cubierta que contiene aspartato y triptófano (por sus siglas en inglés Tryptophan aspartate containing coat protein)

TB= Tuberculosis

TBL= Tuberculosis latente

TLR= receptores tipo Toll (por sus siglas en inglés Toll like receptor)

VDR= Receptor de vitamina D (por sus siglas en inglés Vitamin D receptor)

VDRE = Elementos de respuesta a vitamina D (por sus siglas en inglés Vitamin D response elements)

MHCII= complejo mayor de histocompatibilidad (de sus siglas en inglés major histocompatibility complex class II)

HIV= Virus de inmunodeficiencia humana (por sus siglas en inglés human immunodeficiency virus)

2. RESUMEN

Introducción. La fagocitosis es un mecanismo de la respuesta innata para la eliminación de patógenos llevada a cabo por células fagocíticas (monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos). Este proceso consiste en la internalización de patógenos por dichas células, para su eliminación y posterior activación del sistema inmune adaptativo. Durante la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por los monocitos (MN), se produce el péptido antimicrobiano LL-37 (Catelicidina) que se asocia con eliminación de la micobacteria. Por otro lado, dentro de los mecanismos de supervivencia de *M. tuberculosis* se encuentra la retención de la proteína TACO sobre la membrana del fagosoma y con ello se evita la fusión con el lisosoma y su consecuente eliminación

La vitamina D regula la respuesta inmune innata, aumentando la capacidad de fagocitosis en monocitos (MN), macrófagos y líneas celulares de MN como la THP-1. Aunado a lo anterior se sabe que una vez que interacciona con su receptor intracelular induce la producción de LL-37 y disminuye la transcripción de TACO.

Objetivo. Evaluar el efecto de la Vitamina D en la fagocitosis de *M. tuberculosis* y en la expresión de genes (LL-37, VDR, CYP27B1 y TACO) involucrados en el proceso de activación en MN.

Material y métodos. Se tomó muestra de sangre periférica de 7 voluntarios sanos con heparina como anticoagulante, se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se purificaron los MN por selección positiva usando el anticuerpo-anti-CD14 conjugado a micoperlas metálicas. La pureza de los MN se analizó utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD14PE y anti-CD3PerCP por citometría de flujo. Se infectaron 1×10^5 MN con *M. tuberculosis* H37Ra a MOI de 1 y 10 durante 1 h a 37°C. Por otro lado, 5×10^5 MN fueron incubados con vitamina D (1,10 y 100nM) durante 24 h y posteriormente se infectaron con *M. tuberculosis* H37Ra a MOI de 1 y 10 durante 1 h a 37°C. Concluido el tiempo de infección se removió el medio para eliminar las micobacterias no fagocitadas y los MN se fijaron con metanol. Se realizó la tinción de Kenyou y se evaluó por microscopia reportando la fagocitosis como el porcentaje de MN conteniendo *M. tuberculosis*. La expresión de genes LL-37, VDR, CYP27B1 y TACO se evaluó en MN incubados con vitamina D (1,10 y 100nM) durante 24 h por PCR en tiempo real.

Resultados. La pureza de los MN fue >87 %, en esta población celular se observó que la vitamina D a una concentración de 10 nM aumentó la fagocitosis de *M. tuberculosis* ($P<0.05$). Se cuantificó el número de bacterias por célula y se observó que se fagocitan preferentemente más de 5 micobacterias ($P<0.05$) por célula y en menor proporción de 1 a 2 y de 3 a 5. Adicionalmente, la vitamina D induce la expresión significativa del péptido anti-micobacteriano LL-37 ($P<0.05$).

Conclusión. La vitamina D tiene un papel importante contra la infección de *M. tuberculosis* ya que incrementó la fagocitosis y favoreciendo la actividad bactericida a través de la inducción de la expresión de LL-37 en MN de sujetos sanos.

3. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que pertenece al orden Actinomycetales, este grupo se caracteriza por la presencia de largas cadenas de ácidos micólicos unidos covalentemente a su pared celular. *M. tuberculosis* es un bacilo gram-positivo que mide de 3-5 μm de longitud y se trata de un organismo aerobio intracelular [1, 2].

La TB es un problema de salud pública siendo la segunda causa de mortalidad a nivel mundial debida a un agente infeccioso. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud para el año 2012, reportó 8.6 millones de personas que enfermaron de TB y 1.3 millones murieron por esta causa[3].

La infección con *M. tuberculosis* se transmite de persona a persona y se inicia con la inhalación de bacilos eliminados por pacientes con TB pulmonar activa cuando éste tose, estornuda o escupe. La inhalación de unos pocos bacilos por una persona sana basta para quedar infectada. Una vez dentro del hospedero el reconocimiento de *M. tuberculosis* se realiza mediante los componentes estructurales de su pared celular rica en lípidos tales como: Lipoarabinomana (LMA), ácidos micólicos (AM) y arabinogalactano [4], posteriormente es internalizado por los macrófagos alveolares en un proceso conocido como fagocitosis, y digerido por la fusión con vesículas lisosomales. Sin embargo, algunos bacilos son capaces de escapar a la unión con el lisosoma y sobrevivir dentro del macrófago [5].

A pesar de los fármacos y medidas preventivas empleadas para el control de la TB aún continúa siendo un problema de salud mundial.

3.1 Susceptibilidad a tuberculosis

En el 90% de los sujetos que se infectan con *M. tuberculosis* no desarrolla la enfermedad activa, debido a que las bacterias son controladas por el sistema inmune limitando su replicación, sin embargo, estas no son eliminadas y permanece en un estado latente, a este estado clínico se le conoce como tuberculosis latente (TBL) [6]. Estos individuos no representan un riesgo inmediato a

la salud pública al no ser transmisores de la infección, sin embargo son potenciales focos de infección una vez que su sistema inmune se encuentra debilitado.

El 10% de la población infectada desarrollan la enfermedad, la cual se conoce como TB activa que es altamente infecciosa, se sabe que este grupo de personas desarrollan la enfermedad debido a factores de susceptibilidad como: co-infección con HIV y los trastornos metabólicos como obesidad, desnutrición y diabetes mellitus (DM) que suprimen al sistema inmunológico propiciando la reactivación de la infección [6].

Desde inicios del siglo veintiuno, se ha observado un incremento de la TB activa entre pacientes con diabetes mellitus (DM) y diferentes estudios han evidenciado que existe susceptibilidad de éstos pacientes al desarrollo de la enfermedad [7-11].

De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el 2012, la DM constituyó la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes además de que su comportamiento ha presentado un incremento acelerado en los últimos 15 años [12].

3.2 El sistema inmune

El sistema inmune es una compleja red de órganos y células especializadas para defender al cuerpo de las infecciones. Se distinguen dos tipos: el sistema inmune innato y adaptativo, el primero se caracteriza por tener una respuesta inespecífica, inmediata y no generar memoria, está mediada por células fagocíticas que tienen la capacidad de reconocer partículas y agentes infecciosos para así inmediatamente destruirlos. En cuanto al sistema inmune adaptativo requiere tiempo para tener la respuesta y se caracteriza por ser específico y generar memoria, es mediada por anticuerpos y células de memoria (linfocitos T y B) [13].

3.3 Monocitos

Los monocitos (MN) son células especializadas pertenecientes al sistema inmune innato que se originan en la médula ósea, una vez maduros pasan a al torrente sanguíneo y más tarde migran a los tejidos donde se diferencian en macrófagos específicos del tejido los cuales se nombran según su localización tisular (macrófagos alveolares-pulmón, células de Langerhans-piel, células de Kupffer-hígado, microgliales-sistema nervioso) [13].

En humanos los MN constituyen del 3 al 8% de los leucocitos circulantes y expresan el antígeno CD14 (por sus siglas en inglés cluster of differentiation) un componente del receptor de lipopolisacárido. Los MN CD14 miden 18µm de diámetro y representan del 80-90% de los MN circulantes en sangre [14].

Con base a la expresión de los antígenos CD14 y CD16 se distinguen tres poblaciones de MN: 1) los MN clásicos que se distinguen por su alta expresión de CD14 (CD14⁺⁺CD16⁻), 2) los MN no clásicos que cuentan con bajos niveles de CD14 y altos niveles de CD16 (receptor de baja afinidad para Fc de Inmunoglobulina G) (CD14⁺ CD16⁺⁺) y 3) los MN intermedios con una alta expresión de CD14 y baja de CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁺) [15].

Cuando se produce una infección los MN migran hacia el área infectada donde regulan la respuesta inmune mediante la fagocitosis de patógenos, producción de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12) y producción de citocinas anti-inflamatorias como el factor de crecimiento transformante (TGF-β), interleucina 10 (IL-10) y la producción de moléculas antimicrobianas (metaloproteasas, lisozimas, óxido nítrico, entre otros) para la eliminación de patógenos [16].

Otra de las funciones de los MN es la de presentar antígenos a las células T que son indispensables para el inicio de la respuesta inmune adaptativa.

3.3.1 Reconocimiento de los MN

Los MN pueden reconocer patrones moleculares expresados sobre la superficie de los patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular patterns*) que son conservados y compartidos por un gran grupo de agentes infecciosos. Estos PAMP son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés *pattern recognition receptors*) que se unen en forma específica a los PAMP [13]. Un subconjunto importante de estos PRR pertenece a las clases de los denominados receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés *Toll-like receptors*). Los TLR2, TLR4 y TLR9 juegan un papel importante en la respuesta innata contra *M. tuberculosis*. Los TLR2 forman dímeros con TLR1 o TLR6 y reconocen lipoarabinomanano (LAM), lipomannana (LM), y fosfatidil-inositol-manósido (PIM) del bacilo, mientras que TLR 9 reconoce DNA de *M. tuberculosis* [17].

3.4 Fagocitosis y procesamiento

La fagocitosis constituye la primera línea de defensa que desencadena el organismo cuando éste se enfrenta a antígenos exógenos (patógenos o células infectadas). Este proceso es llevado a cabo por células del sistema inmune llamados fagocitos que incluyen a los MN, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos [18].

El proceso de fagocitosis se refiere a la internalización de grandes partículas (> 5 µm de diámetro) por las células fagocíticas [18, 19]. En este proceso la membrana citoplasmática de la célula engloba al microorganismo, lo endocita y lo encierran en un fagosoma o vesícula fagocítica. En esta fase de la fagocitosis el fagosoma se separa de la membrana citoplasmática y se internaliza en el citoplasma, en cuyo interior entra en contacto con los lisosomas que contienen enzimas digestivas y sustancias bactericidas (enzimas hidrolíticas, defensinas α y β , proteasas, catelicidinas). Tras el contacto, las membranas del fagosoma y del lisosoma se fusionan para formar un fagolisosoma [20] (Figura 1).

El resultado del proceso de fagocitosis es el procesamiento y presentación de péptidos antimicrobianos sobre la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC por sus siglas en inglés major histocompatibility complex) los cuales son reconocidos por los receptores de las células T y activan la respuesta inmune adaptativa [19].

Los microorganismos pueden ser fagocitados más fácilmente si antes son recubiertos por proteínas como las del complemento y los anticuerpos, este proceso es denominado opsonización. El proceso de fagocitosis de *M. tuberculosis* involucra diferentes receptores como: receptores del complemento 1 (CR1), CR2 y CR4 que reconocen bacilos opsonizados con factores del complemento, los receptores de manosa (MR) que reconocen residuos terminales de manosa de la micobacteria y los receptores scavenger que actúan cuando los receptores MR o CRs son bloqueados [21].

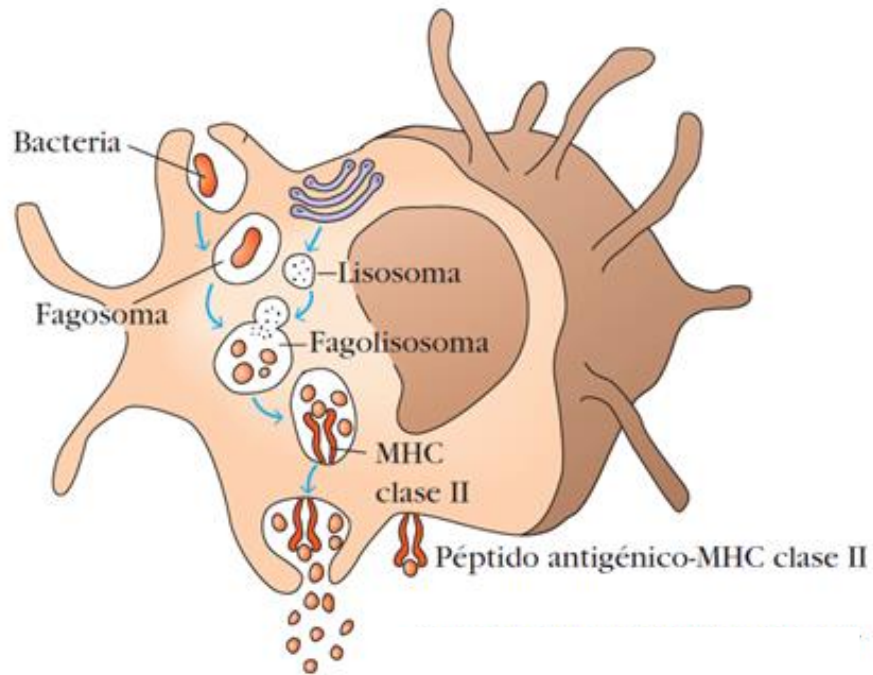


Figura 1. Fagocitosis y procesamiento de antígenos. Los macrófagos son capaces de ingerir y degradar antígenos (bacterias, partículas, desechos celulares etc.). La membrana citoplasmática del macrófago engloba y encierran a la bacteria en un fagosoma el cual entra en contacto con los lisosomas que contienen enzimas digestivas y sustancias bactericidas. Al entrar en contacto el fagosoma y el lisosoma, se fusionan para formar un fagolisosoma donde es degradado el antígeno, posteriormente los productos peptídicos interactúan con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) y forman complejos que se mueven hacia la superficie celular en donde se presentan a las células T. Imagen modificada de Kuby et al. 2007 [20].

3.5 Vitamina D

La vitamina D es un compuesto liposoluble que pertenece al grupo de los esteroides y se caracterizan por la presencia de una estructura raíz llamada ciclo pentano perhidrofenantreno, esta molécula, consta de 17 carbonos dispuestos en tres anillos hexagonales y uno pentagonal [22-24]

La vitamina D (vitamina D₃, colecalciferol) es sintetizada en la piel por medio de la luz ultravioleta (UV) del sol a partir del precursor 7- dehidrocolesterol dando lugar al colecalciferol (vitamina D₃) que es la fuente más importante de este compuesto, sin embargo también puede ser obtenida mediante la ingestión de alimentos que la contengan naturalmente como el aceite de hígado de bacalao, aceite de pescado, crema, mantequilla y huevos [25, 26].

Una vez que la vitamina D₃ ha sido sintetizada o ingerida en los alimentos tiene lugar su primera hidroxilación en el hígado por la enzima CYP27A que involucra una hidroxilación en el carbono 25, dando lugar a la 25-hidroxivitamina D₃, que es el metabolito que se encuentra en mayor concentración en la circulación. Este último, sufre la segunda 1 α - hidroxilación catalizada por la enzima CYP27B1 para generar la 1,25 dihidroxi-vitamina D₃, la forma activa de la vitamina D. El riñón es el órgano en el cual se da la mayor activación de la vitamina D; sin embargo, en células del sistema inmune como las células dendríticas y macrófagos también expresan CYP27B1 involucrada en la generación de la forma activa de la vitamina D [27].

Los metabolitos de la vitamina D son esenciales para un gran número de procesos fisiológicos y cumplen diversas funciones como hormonas, antioxidantes, reguladoras del crecimiento, diferenciación de tejidos, en el desarrollo embrionario, mantiene los niveles séricos de calcio y es capaz de estimular las proteínas implicadas en la absorción intestinal de calcio [28].

Por otro lado, la vitamina D tiene funciones no clásicas que han recibido particular atención debido a que regula el sistema inmune innato aumentando la actividad fagocítica y microbicida de macrófagos. [25].

3.5.1 La vitamina D y la fagocitosis

Además de las funciones clásicas como la homeostasis del calcio y fósforo, la vitamina D tiene un efecto importante dentro la respuesta inmune innata.

Existen diferentes trabajos donde se demuestra que la vitamina D promueve la diferenciación de MN hacia macrófagos, incrementa la capacidad fagocítica de distintos tipos celulares (Tabla 1) y eleva su actividad bactericida promoviendo la producción de péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) [25].

En 1986 Rook y sus colaboradores observaron que la incubación de MN humanos con diferentes metabolitos hidroxilados de vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D, 1,24,25-trihidroxi vitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₃) promueven la maduración celular y la eliminación de *M. tuberculosis*. Por otro lado Crowel et al, en 1987 también demostró, que la adición de vitamina D a los cultivos de macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis* inhibió el crecimiento de la micobacteria [29, 30]. Del mismo modo reportaron que la incubación directa con vitamina D no permitió el crecimiento de la micobacteria, demostrando el efecto activador de la vitamina D en los macrófagos.

Tabla 1. La vitamina D aumenta la capacidad fagocítica de los MN.

Tipo Celular	Observaciones	Referencia
Monocitos/ Macrófagos Humanos	Vitamina D (24nM) incrementa capacidad fagocítica de <i>Escherichia coli</i>	[31]
Células THP-1*	Vitamina D (100nM) aumenta actividad fagocítica de perlas de látex	[32]
Monocitos/ Macrófagos Humanos	Vitamina D (100nM) aumenta fagocitosis de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	[33]

*THP-1= De sus siglas en inglés human acute monocytic leukemia cell line.

3.5.2 Insuficiencias de vitamina D

Las deficiencias de vitamina D están asociadas a enfermedades como el raquitismo la osteoporosis, insuficiencia cardiaca, susceptibilidad a desarrollar DM y TB activa [34].

Se han realizado estudios en distintas poblaciones como la India, China y Este de África en los cuales, se ha encontrado que los individuos con TB tienen bajos niveles de vitamina D en sangre. [35, 36].

La síntesis de vitamina D en la piel, dependerá de la cantidad de melanina presente que permita la entrada de la luz UV pues está actúa como un filtro de los rayos UV que recibe la piel. Por ejemplo los afroamericanos cuentan con niveles bajos de vitamina D y se sabe son más susceptibles a contraer una infección con *M. tuberculosis* [37].

Por otro lado, existen estudios que han demostrado la relación entre los niveles bajos de vitamina D y el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina asociado a DM2; también se ha encontrado que un consumo alto de vitamina D y calcio está asociado con un bajo riesgo de desarrollar DM2. [38, 39]

3.6 Receptor de vitamina D

La vitamina D ejerce su acción activadora a través de su interacción con el heterodímero: receptor de vitamina D (VDR, vitamin D receptor) y el receptor de retinoides (RXR, retinoid X receptor); los cuales, pueden unirse a elementos de respuesta de vitamina D (VDRE, Vitamin D response elements) de genes blancos y así activar su expresión [40, 41].

El VDR se expresa en al menos 30 diferentes tipos celulares incluyendo las del riñón, mamas, próstata, intestino, linfocitos T y B, queratinocitos y MN humanos. Se ha demostrado que la vitamina D induce la expresión de VDR en macrófagos murinos, sin embargo en macrófagos humanos la vitamina D no promueve su expresión, lo anterior nos sugiere que su expresión podría depender de la especie [28, 42].

Para el año 2000 Lui y sus colaboradores monitorearon la expresión de VDR y CYP27B1 en macrófagos humanos; en el cual reportaron que la activación del complejo TLR 2/1 por *M. tuberculosis* aumentan la expresión de VDR y CYP27B1, la enzima que hidroxila la 25-hidroxivitamina D convirtiéndola en su forma biológicamente activa que promueve la expresión de catelicidina, la cual, migra a los fagosomas donde se aloja *M. tuberculosis* causándole la muerte (Figura 2)[37].

3.7 Catelicidina

Las catelicidinas son péptidos antimicrobianos que presentan los vertebrados, en los humanos solo se ha descrito la existencia de una la hCAP-18 (human cathelicidin antimicrobial protein 18KDa) que en su extremo carboxilo C-terminal contiene una región de 37 aminoácidos con amplia actividad microbicida. Este fragmento de 37 aminoácidos, la hCap-19, es cortado por la proteinasa 3 y recibe el nombre de LL-37 (por iniciar con dos leucinas y tener 35 aminoácidos de longitud [43]). El péptido LL-37 cuenta con amplio espectro microbicida y se ha observado que pueden matar bacterias gram-negativas, gram-positivas, hongos, virus y micobacterias entre estas a *M. tuberculosis* [44, 45].

LL-37 se expresa en varios tipos celulares bajo una gran variedad de estímulos [43]. En el caso de las células del sistema inmune la infección de macrófagos alveolares, linfocitos, neutrófilos y MN con *M. tuberculosis* estimula la producción de LL-37 [46]. En varios estudios se ha demostrado que los MN tratados con vitamina D induce la expresión del gen LL-37 dejando en claro que la vitamina D activa los MN mediante la inducción del gen LL-37 y su efecto inhibidor de *M. tuberculosis* [47-50].

LL-37 actúa sobre la membrana de los patógenos formando poros que llevan a la lisis del microorganismo. LL-37 llega a la membrana interna por atracción electrostática como oligómeros, que se disocian en monómeros e interactúan con la membrana causando la formación de poros debido a su incorporación en la membrana. Al final se lleva a cabo la lisis celular por choque osmótico lo que conlleva a la muerte del microorganismo. [45, 51]

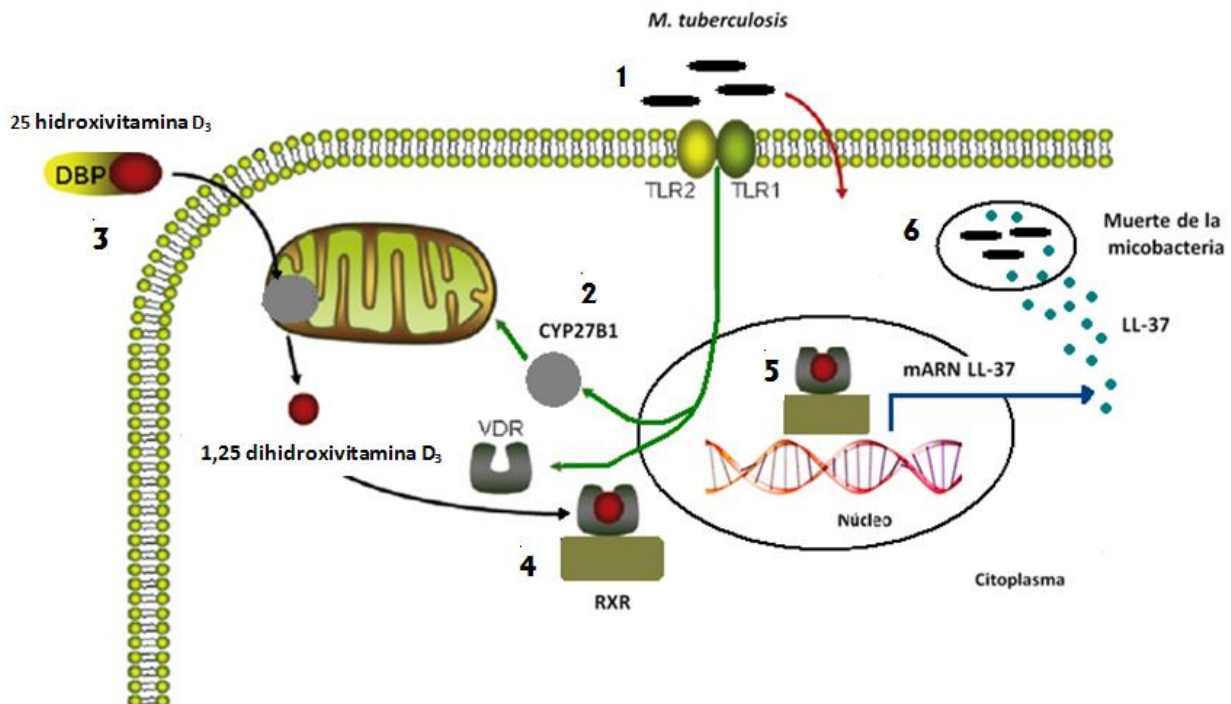


Figura 2. Efecto de la vitamina D en la actividad antimicrobiana de monocitos. (1) *M. tuberculosis* es fagocitado por los MN que, a su vez, desencadena la activación del heterodímero TLR1/TLR 2. **(2)** Esta activación favorece la expresión del receptor de vitamina D (VDR) y la 1α -hidroxilasa (CYP27B1). **(3)** La vitamina D (25-hidroxitamina D_3) en circulación es transportada por la proteína de unión de vitamina D (DBP) y es liberada en el MN donde es convertida en su forma activa (1,25-dihidroxitamina D) en la mitocondria por la enzima CYP27B1. **(4)** La vitamina D activa, entonces, se une al VDR y al receptor de retinoide (RXR) formando un complejo que entran al núcleo **(5)** donde se unen a elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), en las regiones promotoras del gen LL-37. **(6)** La proteína ya sintetizada se dirige al fagosoma donde se encuentra *M. tuberculosis* provocando su muerte. Imagen modificada de Hewison 2010 [48].

3.8 TACO

La patogenicidad de *M. tuberculosis* está relacionada con su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro de las células hospedadoras como MN y macrófagos. Uno de los mecanismos de evasión por *M. tuberculosis* dentro del MN/macrófago es evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma. Este evento está relacionado con la habilidad de la micobacteria para escapar de los mecanismos microbicidas del macrófago [52].

Un análisis de la composición proteica del fagosoma con micobacterias viables, mostró la presencia de una proteína implicada en mantener a salvo a *M. tuberculosis* dentro del fagosoma. Esta proteína es TACO (por sus siglas en inglés tryptophan aspartate containing coat protein), también llamada Coronina 1, que se asocia con el colesterol de la membrana plasmática y su retención en el fagosoma, permite a la micobacteria escapar de los efectos microbicidas del MN/macrófago [53].

Típicamente, TACO se encuentra en la membrana del fagosoma en etapas tempranas y a medida que el fagosoma madura TACO se libera de este facilitando así la fusión del fagosoma con el lisosoma. Ferrari y sus colaboradores encontraron que TACO es retenido en fagosomas que contienen únicamente bacilos vivos, lo cual, retrasa su maduración y evita la actividad bactericida de los MN/macrófagos; sin embargo en fagosomas con bacilos no viables TACO es liberado permitiendo su maduración y la consecuente degradación de la micobacteria (Figura 3) [54].

Estos resultados sugieren que la retención de TACO en el fagosoma es estrictamente dependiente de la viabilidad de *M. tuberculosis* y este proceso es un mecanismo de evasión para la supervivencia de la micobacteria dentro del macrófago [54, 55].

Es importante señalar que se ha demostrado que la vitamina D así como el ácido retinoico reprimen la expresión de TACO a nivel transcripcional favoreciendo la maduración del fagosoma y la consecuente eliminación de *M. tuberculosis*. [56, 57].

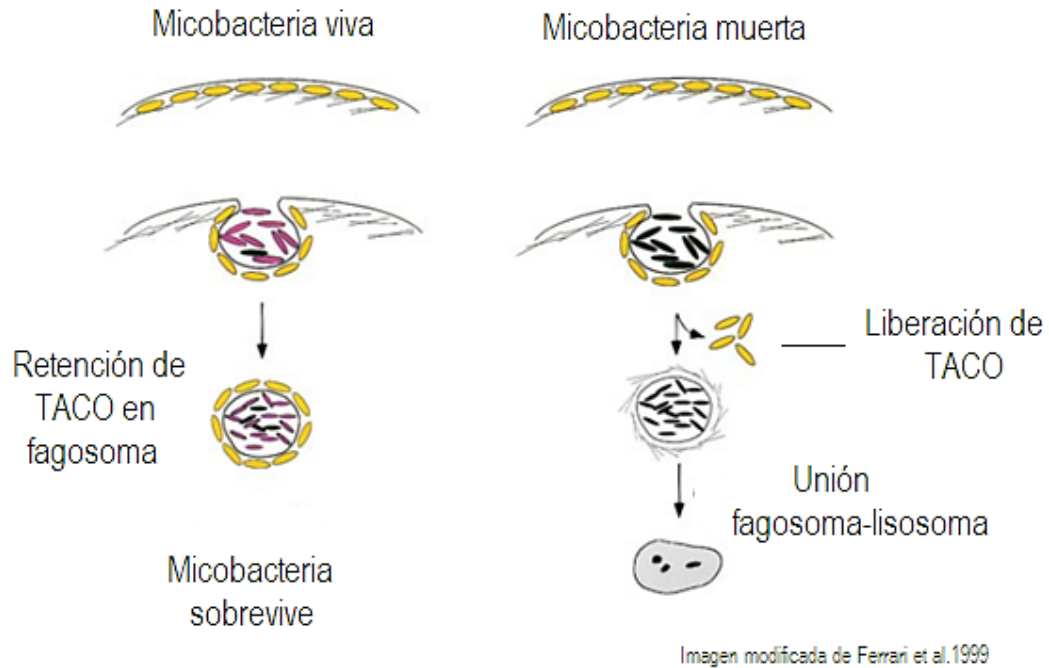


Figura 3. Papel de TACO en la supervivencia de *M. tuberculosis*. TACO se encuentra en el lado citosólico de la membrana celular. Durante la fagocitosis de *M. tuberculosis* no viables (negro), TACO se asocia con el fagosoma y medida que éste madura, TACO es liberado permitiendo su maduración y posterior unión con el lisosoma. En el caso de una bacteria viable (violeta), TACO es retenido en la membrana del fagosoma, retrasando su maduración y su consecuente unión con el lisosoma, evitando así la destrucción de *M. tuberculosis*. Imagen modificada de Ferrari et al. 1999 [51].

La vitamina D participa en la activación de los MN/macrófagos promoviendo un aumento de su capacidad fagocítica hacia de *M. tuberculosis*, también promueve mecanismos que incluyen la producción de péptidos antimicrobianos como LL-37 y la eliminación de las bacterias dentro de los lisosomas por parte de los macrófagos por medio de la represión de TACO.

Por lo anteriormente descrito es de gran interés estudiar el papel de la vitamina D en la inmunidad innata como la fagocitosis de *M. tuberculosis* y, así mismo, evaluar su efecto sobre la expresión de genes.

4. JUSTIFICACIÓN

La Tuberculosis (TB) es un problema de salud pública, siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial dentro de las enfermedades infecciosas. Se estima que una tercera parte de la población está infectada y se ha demostrado que los pacientes con diabetes mellitus son más susceptibles a la TB.

Por otro lado, la vitamina D incrementa la capacidad fagocítica en MN y se ha descrito que regula genes como LL-37, VDR, CYP27B1 y TACO involucrados en el control de *M. tuberculosis*.

Es poco lo que se conoce del efecto de la vitamina D en el sistema inmune innato en especial en el proceso de fagocitosis. A través del estudio en sujetos sanos, inmunológicamente competentes, se pretende evaluar la fagocitosis de *M. tuberculosis* por MN pre- tratados con vitamina D y estudiar su efecto en la expresión de genes asociados en su proceso de activación.

5. HIPÓTESIS

El pre-tratamiento de MN con vitamina D, aumentará la fagocitosis de *M. tuberculosis* y la expresión de genes como LL-37, VDR, CYP27B1 y TACO involucrados en la activación de mecanismos bactericidas de estas células.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la vitamina D en la fagocitosis de *M. tuberculosis* y la expresión de LL-37, VDR, CYP27B1 y TACO en MN humanos.

Objetivos particulares

1. Evaluar la fagocitosis de *M. tuberculosis* a multiplicidad de infección de 1 y 10 mediante análisis microscópico.
2. Estudiar el efecto del pre-tratamiento de los MN humanos con vitamina D durante 24h sobre la fagocitosis de *M.tuberculosis* H37Ra.
3. Evaluar el efecto del pre-tratamiento con la vitamina D en la expresión del mRNA de LL-37, VDR, CYP27B1 y TACO en MN de voluntarios sanos por PCR en tiempo real.

7. MATERIAL Y MÉTODO

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

7.1 Grupo de estudio

Se incluyeron 7 sujetos sanos (5 mujeres y 2 hombres), quienes voluntariamente participaron en este protocolo. Los voluntarios no mostraron signos de enfermedades inflamatorias ni desnutrición. La edad promedio fue de 25 ± 9.72 años.

7.2 Separación de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron 60 mL de sangre periférica de los voluntarios, y se utilizó heparina como anticoagulante. De la sangre total se aislaron células mononucleares utilizando un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Brevemente, de la muestra de sangre (20 mL) heparinizada se diluyó 1:2 con en medio RPMI (BioWhittaker Walkersville, MD) + 2 mM de L- glutamina (RPMI +G) en un tubo de 50mL, paso seguido, se le colocó una pipeta Pasteur por la cual se le fue agregando Ficoll (LymphoPrep™ Oslo, Noruega) hasta llegar a un volumen de 50 mL. Se centrifugó a 1200 rpm durante 45 min a 25°C. Posteriormente, se separó el anillo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), con ayuda de una pipeta de transferencia en un tubo de 50 mL. Se realizaron tres lavados con medio RPMI + G centrifugando a 1200 rpm durante 15 min a 4°C. En el último lavado se eliminó completamente el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 2 mL de medio RPMI+ G, para determinar la viabilidad y la concentración celular. En breve, de esta suspensión celular se tomaron 10 μ L de la suspensión y 10 μ L de azul de tripano (GIBCO) se mezclaron y 10 μ L y se colocaron en la cámara de Neubauer para determinar la viabilidad y el número de células.

7.3 Separación de MN

A partir de los PBMC purificados de sangre periférica, los MN se separaron por selección positiva empleando microperlas metálicas conjugadas a anticuerpos monoclonales anti-CD14 humano utilizando el kit de Miltenyi (MACS® Miltenyi-Biotech Auburn, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En breve, los PBMC se centrifugaron 10 min a 1500 rpm a 4 °C y se eliminó completamente el medio de cultivo (RPMI + G) y el paquete celular se resuspendió

perfectamente en 80 μ l de buffer de Miltenyi (PBS= 0.01 M, pH =7.2, BSA 0.5 %, EDTA 2 mM, (Anexo 1) por cada 1×10^7 células totales, las cuales se incubaron con 10 μ l de MicroBeads-CD14 (Miltenyi-Biotech) por cada 1×10^7 células, durante 15 min a 4°C. Después de la incubación se realizó un lavado con 2 mL de buffer de Miltenyi por cada 1×10^7 células y se centrifugó 10 min a 1500 rpm a 4°C. A continuación el paquete celular se resuspendió en 500 μ l de buffer de Miltenyi por cada 1×10^8 células, en este último paso las células estuvieron listas para pasar por la columna.

La columna con el prefiltro se colocó en el magneto y se pre- humedeció con 500 μ l del buffer de Miltenyi. En seguida se agregó la suspensión celular por el pre-filtro pasándola por la columna y se lavó 5 veces con 500 μ l del buffer, la fracción negativa pasa libremente y se recolectó en un tubo. Por otro lado, la fracción positiva, que quedó en la columna, se recuperó removiendo la columna del magneto y agregando 1 mL del buffer de Miltenyi, con ayuda del embolo se eluyó a un tubo. A continuación se centrifugó a 1500 rpm 10 min a 4 °C y se eliminó completamente el buffer y los MN purificados se resuspendieron en 1 mL de medio RPMI+G+10% suero humano descomplementado. Se determinó la viabilidad y la concentración de los MN empleando azul de tripano (GIBCO) que distingue entre las células vivas y muertas, debido a que las células viables con membrana intacta no permite la entrada de azul de tripano, por el contrario las células muertas muestran un color azul. La suspensión se ajustó a la concentración de 1×10^6 MN/ml con medio de cultivo.

7.4 Evaluación de pureza de MN

La pureza de la población de MN (CD14+) se evaluó mediante citometría de flujo. Para ello, se hizo la tinción de superficie como a continuación se describe: se tomaron 1×10^5 células de la fracción positiva (CD14+) y de la negativa (CD14-), y se colocaron en un tubo para citometría e incubaron con 3 μ l de los anticuerpos anti-humanos CD14PE y anti-CD3PerCp (BD Bioscience) durante 15 min a 4 °C. Se lavó con 1 mL de Buffer de fosfato salino (Biowhittaker, Lonza) con 2 % de suero fetal bovino (PBS 2 % SFB) y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el sobrenadante y las células se fijaron con 200 μ L de paraformaldehído (Sigma) al 1 %. Se adquirieron 50,000 eventos para cada fracción en el citómetro FACS Calibur (BD) y se hizo el análisis con el programa Cellquest (BD). Los resultados fueron reportados como porcentaje de células CD14⁺.

7.5 Descongelamiento y disgregación de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*

En una caja de unicel se transportó del ultracongelador (REVCO) al cuarto de cultivo el vial de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (ATCC 25117; American Type Culture Collection Manassas, VA). El vial se descongeló dentro del gabinete de bioseguridad, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 8 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante, paso seguido se resuspendió en 1 mL de medio RPMI + G + 10% de suero humano descomplementado y se mezcló en vortex. Para disgregar la bacteria se empleó una jeringa de 3 mL (aguja de 21 G X 32 mm) con la cual se subió y bajó 10 veces; posteriormente se hizo lo mismo con una jeringa de 1 mL (aguja 30 G X 13 mm). Terminado este paso, el vial se sonico durante 1 m a la máxima frecuencia del sonicador (Sonicador Ultrasonic Processor) y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 min y el sobrenadante libre de agregados bacterianos, se transfirió a un vial nuevo este último se ajustó a una concentración de 1×10^7 micobacterias/mL. A partir de esta suspensión se realizaron los cálculos correspondientes para los ensayos de la infección de los MN.

7.6 Evaluación de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por MN

En una cámara de 8 pozos (Chamber slide Labtek II) se agregaron 100 μ L de la suspensión de MN CD14+ para tener de 1×10^5 células por pozo. Se dejaron adherir durante 1 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente los MN se infectaron con *M. tuberculosis* H37Ra a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:1 (un MN con una micobacteria) y 1:10 (un MN con 10 micobacterias). Los MN infectadas se incubaron durante una hora a 37°C y 5 % de CO₂, se incluyeron dos pozos sin infección por condición experimental. Al término de la incubación se eliminó el sobrenadante y se lavó 3 veces con 200 μ L medio RPMI + G a temperatura ambiente. Se removió completamente el sobrenadante de los pozos y las células se fijaron agregando 100 μ L de metanol /pozo; se incubó por 10 m a 37°C en 5 % CO₂. Se dejó secar en el gabinete de bioseguridad.

7.7 Evaluación de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por MN pre-tratados con vitamina D

Para ver el efecto del pre-tratamiento de los MN con la forma activa de la vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D₃) sobre la fagocitosis de *M. tuberculosis*, los MN se incubaron con diferentes concentraciones de vitamina D (Sigma Chemical CO. San Louis, MO) 1, 10 y 100 nM durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂ incluyendo adicionalmente una condición sin vitamina D. Posteriormente, se removió el medio y las células se infectaron una hora con *M. tuberculosis* H37Ra a una

multiplicidad de infección (MOI) de 1:1 y 1:10 en medio RPMI+G. Se eliminó el sobrenadante y se lavó 3 veces con 200 μ L medio RPMI + G a temperatura ambiente. Se removió completamente el sobrenadante de los pozos y las células se fijaron agregando 100 μ L/pozo, de metanol; se incubó por 10 min a 37 °C en 5 % CO₂. Se dejó secar en el gabinete de bioseguridad.

7.8 Tinción de *M. tuberculosis* por el método de Kenyou

De los ensayos de fagocitosis se hizo la tinción con el kit TB Quick-Stain (BD) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, la laminilla se removió y se cubrió con Carbol-fucsina durante 4 min a temperatura ambiente; pasado el tiempo se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se adicionó el decolorante (TB decolorizer) durante 3 s y se lavó con agua corriente. Para realizar la contra-tinción se utilizó verde brillante (TB brilliant Green K) el cual se dejó 30 s, se lavó con agua hasta eliminar el exceso de colorante. La laminilla se dejó secar a temperatura ambiente. Se hicieron los análisis al microscopio con aceite de inmersión en el objetivo de 100X, se contaron las células y los resultados se reportaron como porcentaje. En promedio se contaron 566 células/laminilla. Para ver método de conteo ir al Anexo.

7.9 Tratamiento de MN con la vitamina D sobre la expresión de genes

En una placa de 24 pozos se adicionó 500 μ L de la suspensión de MN (5×10^5 por pozo). Se dejaron adherir durante 1 h y se estimularon con diferentes concentraciones de vitamina D a 1, 10 y 100 nM por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se removió completamente el sobrenadante y las células se lisaron con 350 μ L del buffer de lisis (RLT) y se guardaron a -20 °C hasta ser procesadas en la extracción de RNA.

7.10 Extracción de RNA total por columna

Para la separación del RNA por columna se empleó el sistema RNeasy Mini Kit (Quiagen Maryland) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En breve, el lisado celular se transfirió a un tubo y se agregó 350 μ L de etanol al 70 % y se transfirió 700 μ L de la muestra a la columna, la cual se centrifugó 20 s a 12000 rpm. Posteriormente la columna se lavó con 350 μ L de la solución RW1 y se centrifugó 20 s a 12000 rpm. El DNA genómico fue removido por la adición de 80 μ L de la mezcla de DNasa I (Anexo I), e incubando a temperatura ambiente durante 15 m y se lavó con 350 μ L del buffer RW1, se centrifugó 20 s a 12000 rpm Después se añadió 500 μ L del buffer RPE y se centrifugó 20 s a 12000 rpm.

Por último la columna se transfirió en un nuevo tubo al cual se le añadió 20 µL de agua libre de RNasas sobre la membrana de la columna y se centrifugó 1 min a 8000 rpm para eluir el RNA. Se repitió este último paso recolectando un volumen final de 40 µL de RNA total que fue almacenado a -20° C hasta el momento de su utilización.

7.11 Síntesis de DNA complementario

La síntesis del DNA complementario se hizo por transcripción reversa del RNA total empleando el kit SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los reactivos se mezclaron y se centrifugaron. A continuación para cada muestra se agregó: 8 µL de RNA muestra, 1 µL de Random hexamers (50 ng/ µL) y 1 µL de la mezcla 10 nM dNTP. Las reacciones se incubaron a 65 °C durante 5 min y posteriormente 1 min en hielo. Mientas tanto se preparó la mezcla de reacción para transcripción reversa-RT (Ver anexo 1) .Posteriormente se agregó 9 µL de la mezcla de reacción RT a cada una de las muestras y se incubaron a 25 °C por 2 m y se agregó 2 µL de la enzima SuperScript II RT a cada una de las muestras, se mezcló y se llevó a cabo la síntesis en el termociclador (iCycler, BIO-RAD) con las siguientes condiciones: 25 °C, 10 min; 42°C, 50 min y 70 °C, 15 min. Al finalizar la síntesis las muestras se colocaron en hielo y se le agregó 1 µL de RNase H (2U/µL) a cada una de las muestras y se incubaron 20 min a 37 °C. El cDNA se guardó a -20 °C hasta ser utilizado para la amplificación por PCR en tiempo real.

7.12 Análisis de expresión de mRNA por PCR en tiempo real

Se analizó la expresión del mRNA de VDR, Catelicidina LL-37, TACO, CYP27B1 y el gen constitutivo 18S ribosomal. El cDNA templete se descongeló y se diluyó 1:5 con agua DEPC, posteriormente se realizó la mezcla de reacción, master Mix, para la expresión de genes (Ver anexo I) para cada uno de los ensayos pre-diseñados: VDR (Hs01045840_m1) CAMP* (Hs00189038_m1), TACO (Hs00200039_m1), CYPB27B1 (Hs00168017_m1) marcados con FAM y 18S (Applied Biosystems) marcado con VIC.

Se mezclaron en un tubo 34 µL del master Mix y 8 µL del cDNA, posteriormente en una placa de 96 pozos (Applied Biosystems Foster City, CA), por duplicado, se añadió 20 µL por pozo de

* CAMP= Péptido antimicrobiano Calelicidina por sus siglas en inglés cathelicidin antimicrobial peptide.

la mezcla anterior. La placa fue sellada con plástico adhesivo óptico (Applied Biosystems) y se centrifugó 10 min a 1500 rpm a temperatura ambiente. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador StepOne PlusSystem (Applied Biosystems) las temperaturas de amplificación empleadas fueron 50°C 2 min, 95 °C 10 min y posteriormente 40 ciclos a 95 °C – 30 seg y 62°C -1 min. Los resultados se analizaron empleando el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), referidos a la condición experimental si estímulo. Reportando los resultados como incrementos con respecto al calibrador. Para ver fórmulas utilizadas ver anexo.

7.13 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm la desviación estándar (SD). Para comparar dos grupos se utilizó la prueba t-student para datos paramétricos y Mann-Whitney para datos no paramétricos. Los datos fueron analizados utilizando el software Graphpad Prism (versión 5.0). Un valor de $P \leq 0.05$ se consideró significativo.

8. RESULTADOS

Pureza de Monocitos

La base de esta investigación es la población de MN que son importantes para el control y eliminación de microorganismos intracelulares como *M. tuberculosis*.

En el presente estudio se trabajaron con MN de siete sujetos sanos separados por selección positiva (CD14+), la pureza de la población CD14+ se analizó por citometría de flujo. En la figura 1 se muestra un dot plot de CD14-FITC vs granularidad y un histograma. Como puede observarse nuestra población de MN tiene un porcentaje de contaminación por linfocitos. Aunque es importante mencionar que el promedio de la pureza de los monocitos fue del 87%.

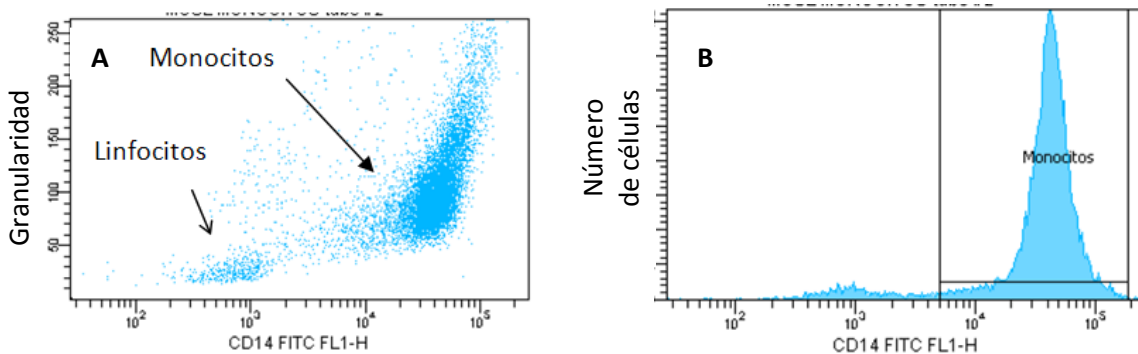


Figura 1. Pureza de monocitos. MN CD14+ fueron separados de PBMC los cuales fueron teñidos con anti-CD 14- FITC. **A.** Dot plot Granularidad vs CD14FITC. **B.** Histograma

La fagocitosis de *M. tuberculosis* incrementa con el MOI

Uno de los objetivos propuestos fue evaluar la fagocitosis de *M. tuberculosis* a multiplicidades de infección (MOI) 1 y 10, para así evaluar la cantidad de micobacterias fagocitadas.

Como se muestra en la figura 2 la fagocitosis de *M. tuberculosis*, se incrementó significativamente para el MOI de 10 en comparación con el MOI de 1 (MOI 1=5% vs MOI 10= 13%, $p < 0.05$). Demostrándose con estos resultados, que nuestro sistema funciona como ya se ha reportado [58, 59]. Este mismo comportamiento se observó cuando los MN son pre-tratados con vitamina D (Figura 3).

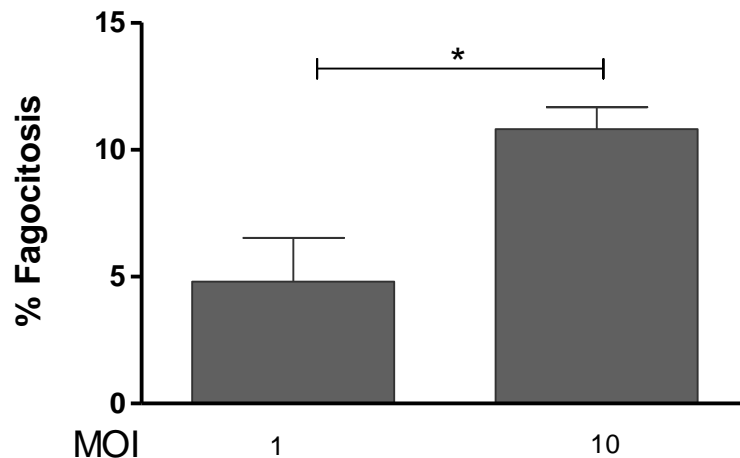


Figura 2. La fagocitosis de *M. tuberculosis* a MOI de 10. Los MN se infectaron a multiplicidad de infección (MOI) 1 y 10 con *M. tuberculosis*. Posteriormente se hizo la tinción y se analizó en el microscopio. Los resultados de fagocitosis se reportaron en porcentaje de células con micobacterias. Las barras representan la media y líneas verticales la desviación estándar (SD), n=7, t-student *p<0.05, MOI 1 vs MOI 10.

Los MN pre-tratados con las diferentes concentraciones de vitamina D durante 24h muestran un aumento en la fagocitosis total de *M. tuberculosis* a MOI de 10

Como se ha descrito en la literatura uno de los efectos de la vitamina D es aumentar la capacidad fagocítica de células del sistema inmune [31-33]. Es por eso que se estudió el efecto de tres concentraciones de vitamina D (1,10 y 100 nM) sobre la fagocitosis de *M. tuberculosis* por MN de sujetos sanos.

En la figura 3 se observó que la fagocitosis de los MN pre- tratados durante 24h con 1, 10 y 100nM de vitamina D al MOI de 1 son comparables con los MN sin tratamiento de vitamina D, mostrando que para el MOI de 1 el efecto del pre-tratamiento de los MN con vitamina D no modifica la fagocitosis.

Sin embargo, al MOI de 10 se observó un aumento significativo (*p<0.05) de la capacidad fagocítica de los MN hacia *M. tuberculosis*, cuando son pre-tratados con 10nM de vitamina D, en comparación con los MN sin pre-tratamiento. Para el caso de MN pre-tratados con 1 y 100 nM de vitamina D se observó únicamente una tendencia al aumento de su capacidad fagocítica respecto a la condición sin vitamina D, pero no fue significativo.

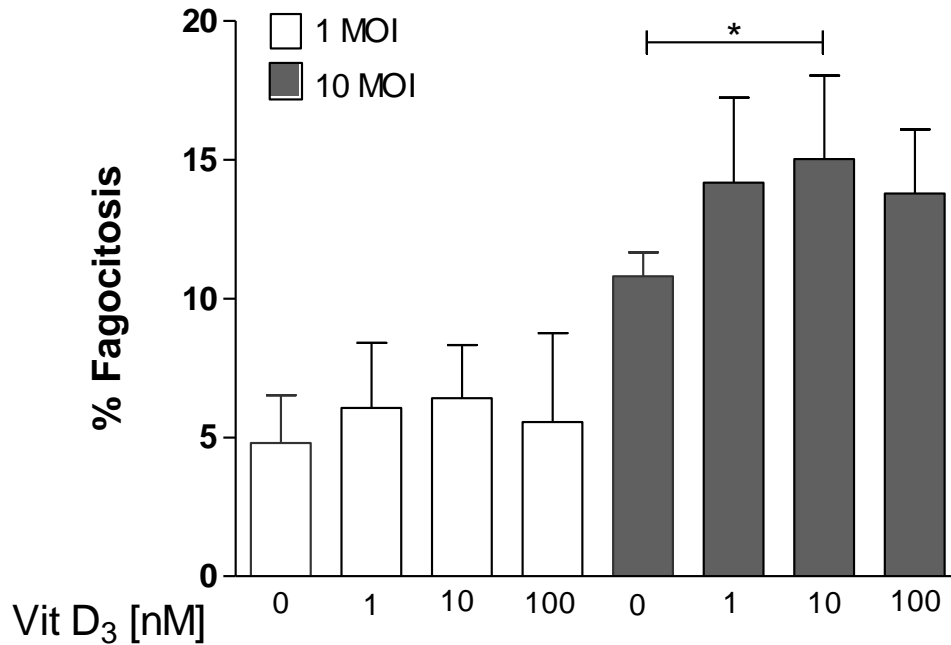


Figura 3. Efecto de la vitamina D sobre la fagocitosis total de *M. tuberculosis*. Los MN de sujetos sanos fueron pre-tratados con diferentes concentraciones de vitamina D (1, 10 y 100nM) durante 24hrs, posteriormente se infectaron con *M. tuberculosis* a multiplicidad de infección (MOI) 1 y 10. Se hizo la tinción, se analizó en el microscopio y los datos se reportaron en porcentaje de fagocitosis. Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación estándar (SD), n=7. *p<0.05, Prueba t-student, (10nM/ sin vitamina/MOI10 D vs. 10nM vitamina D/MOI10).

Los MN fagocitan cúmulos de *M. tuberculosis*

En el análisis de la fagocitosis por microscopía, se observó que los MN sin vitamina D y pre-tratados con 1, 10 y 100nM de vitamina D fagocitaron pocas micobacterias (1, 2-3,3-5), sin embargo se observó que los MN fagocitaron principalmente cúmulos de *M. tuberculosis*. (Figura 4, panel A-D).

Para tratar de explicar la fagocitosis de cúmulos micobacterianos se preparó una suspensión de *M. tuberculosis* y se sometió a las mismas condiciones de incubación. Lo que se pudo observar es que las micobacterias se agregan (Figura 4, panel E) lo anterior nos deja en claro que este fenómeno se debe a la naturaleza lipídica de la micobacteria.

Por otro lado se observó que la vitamina D promovió un cambio morfológico en los MN pues a medida que aumentó la concentración de vitamina D los MN aumentaron de tamaño, prolongaciones y vesículas (Figura 4, panel A-D).

Para el análisis de la fagocitosis, los MN se clasificaron en 3 rangos según el número de micobacterias que internalizaban. Se agruparon en aquellos que fagocitaron de 1 a 2 (baja fagocitosis), de 3 a 4 (mediana fagocitosis) y más de 5 bacilos de *M. tuberculosis* (alta fagocitosis), este análisis fue aplicado a la fagocitosis de MN pre-tratados con las diferentes concentraciones de vitamina D (1, 10 y 100 nM). En la fagocitosis sin vitamina D (figura 5A), los MN fagocitaron significativamente más de 5 bacilos comparado con MN que tienen baja y mediana fagocitosis (3 a 4 bacilos y más de 5 bacilos) (* $P < 0.05$), esta observación fue consistente en el MOI de 1 y 10. En cuanto a MN pre-tratados con las diferentes concentraciones de vitamina D (figura 5B, C y D) se observó el mismo patrón, es decir, para MOI de 1 y 10 los MN fagocitan más de 5 bacilos de *M. tuberculosis* (* $P < 0.05$). Lo anterior nos dice que la fagocitosis de acúmulos micobacterianos es independiente del MOI de infección y el pre-tratamiento de los MN con vitamina D.

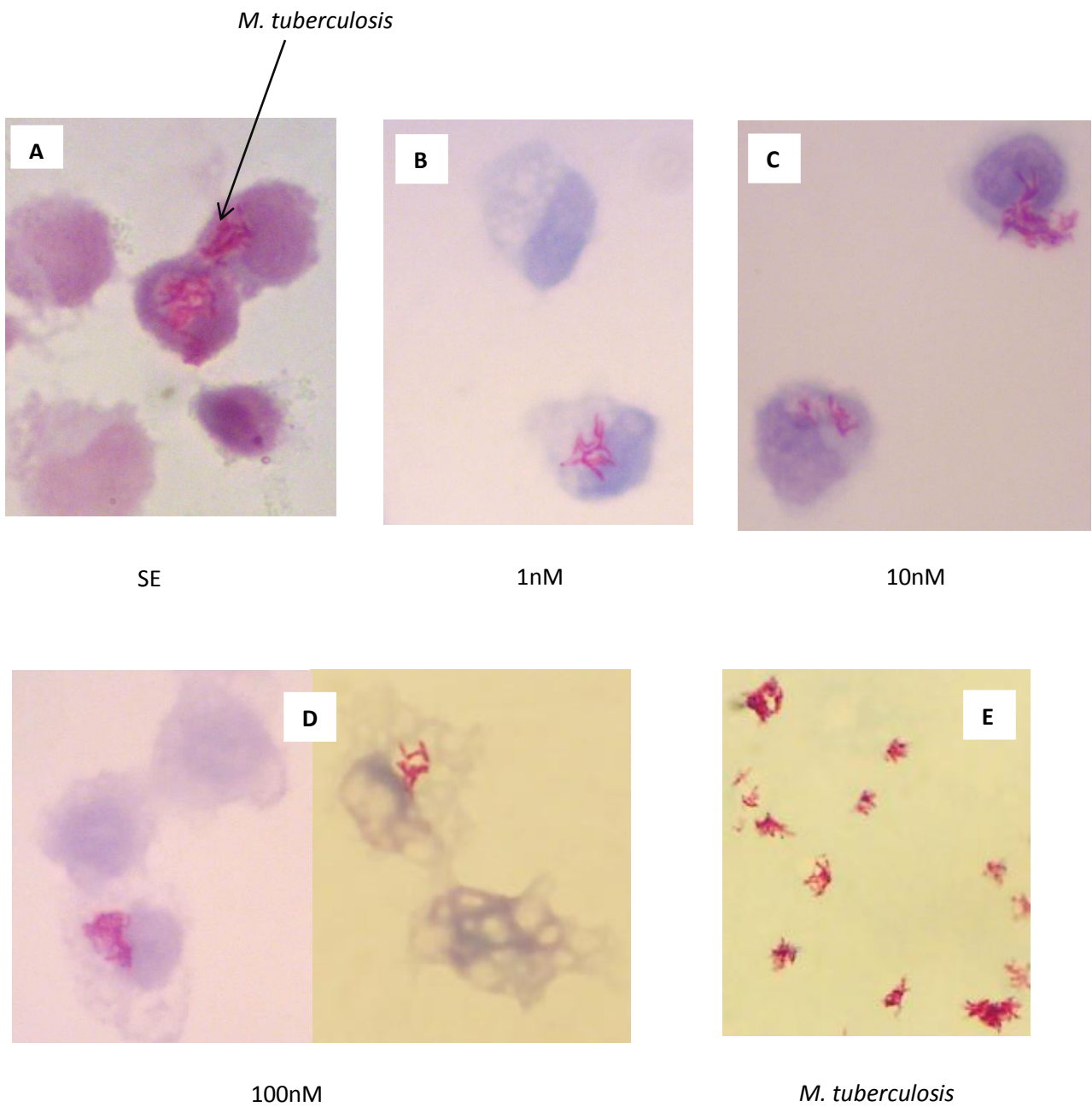


Figura 4. Los MN fagocitan preferentemente cúmulos de más de cinco *M. tuberculosis*. Los MN fueron pre-tratados con vitamina D y se infectaron a MOI de 10, posteriormente se realizó la tinción de Kinyou. **A)** Fagocitosis sin vitamina D. **B-D)** Fagocitosis de MN pre-tratados con 1, 10 y 100 nM de vitamina D respectivamente. **E)** Suspensión homogenizada de *M. tuberculosis*.

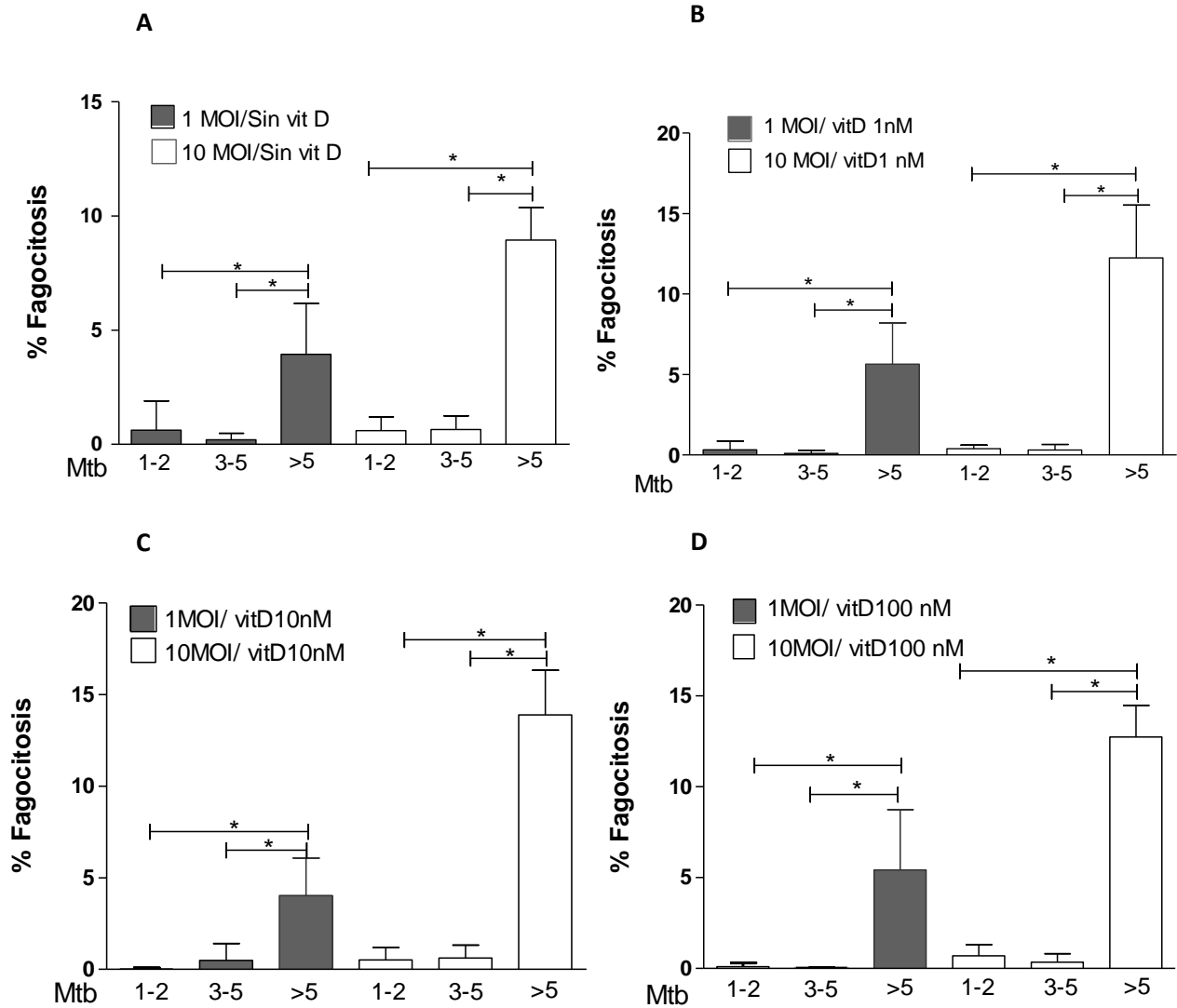


Figura 4. Los MN fagocitan preferentemente cúmulos de *M. tuberculosis*. Los MN sin tratamiento o con pre-tratamiento de vitamina D por 24h se infectaron a multiplicidad de infección (MOI) 1 y 10 con *M. tuberculosis* (Mtb). Se hizo la tinción y se analizó en el microscopio y la fagocitosis se reportó en porcentaje. Los MN se agruparon en aquellos que fagocitaron de 1-2, 3-4 y >5 *M. tuberculosis* (Mtb). **A)** MN sin vitamina D **B)** MN tratados con 1nM de vitamina D **C)** MN tratados con 10nM de vitamina D **D)** MN tratados con 100nM de vitamina D. Las barras representan la media y líneas verticales la desviación estándar (DS). (n=7), *p<0.05, Prueba t-student.

El pre-tratamiento de vitamina D con 10 y 100nM aumenta la capacidad fagocítica de MN que fagocitan más de 5 bacilos

El efecto de la vitamina D sobre la fagocitosis se analizó a nivel de los rangos formados según las bacterias que internalizaban los MN (baja fagocitosis, mediana fagocitosis y alta fagocitosis), únicamente para el MOI de 10, puesto que bajo ésta condición se observó un mayor porcentaje de fagocitosis.

En los grupos de MN con baja y mediana fagocitosis no se observó el efecto de las concentraciones de vitamina D comparado con los MN sin vitamina D (Figura 6).

En MN pertenecientes al grupo de alta fagocitosis, se observó que el pre-tratamiento con 1 nM de vitamina D existe una tendencia al aumento de la fagocitosis comparado con la condición si estímulo, sin embargo no fue significativo. Por otro lado se observó que para este mismo grupo (alta fagocitosis) el pre-tratamiento con 10 y 100nM de vitamina D aumentó significativamente su capacidad fagocítica ($P < 0.05$) comparado con la condición sin estímulo. Lo anterior nos dice que un pre-tratamiento de los MN con 10 y 100 nM de vitamina D aumenta la capacidad fagocítica de MN que fagocitan más de 5 bacilos de *M. tuberculosis* (Figura 6).

En resumen, los experimentos presentados en éste trabajo, mostraron que los MN pre-tratados con 10nM de vitamina D aumentan su capacidad fagocítica. Por otro lado independientemente del pre-tatamiento con la vitamina D, los MN fagocitan principalmente cúmulos de *M. tuberculosis*; en éste mismo grupo la vitamina aumentó su capacidad fagocítica con una concentración de 10 y 100 nM de vitamina D.

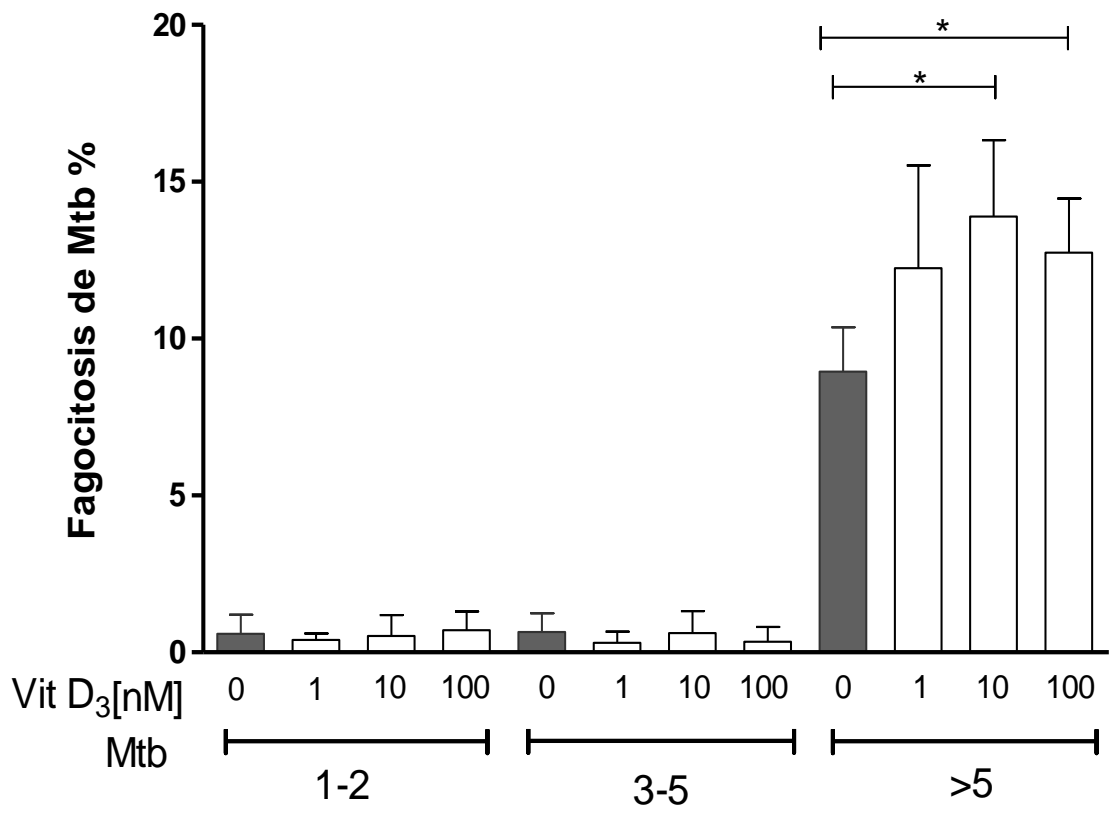


Figura 6. El pre-tratamiento con 10 y 100nM de vitamina D aumenta la capacidad fagocítica de MN que fagocitan >5 bacilos. Los MN de sujetos sanos fueron tratados en presencia de o ausencia (SE) de 10 y 100 nM de vitamina D durante 24hrs posteriormente se infectaron a multiplicidad de infección 10. Los MN se agruparon en aquellos que fagocitaron de 1-2, 3-4 y >5 *M. tuberculosis* (Mtb). Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación estándar (SD), n=7, t-student *p<0.05, 10nM vs 0; 100nM vs 0.

La vitamina D induce la expresión dosis-dependiente del gen catelicidina LL-37

Se ha demostrado que la vitamina D induce la expresión de LL-37, un péptido involucrado en la muerte de la micobacteria [37, 47-49]. Es por ello que se analizó su efecto sobre la expresión de LL-37 en MN estimulados con diferentes concentraciones de vitamina D (1, 10 y 100nM) durante 24 horas por PCR en tiempo real. En la figura 7 se muestra que la expresión del mRNA de LL-37 aumenta con la concentración de vitamina D de una manera dosis-dependiente ($P < 0.05$).

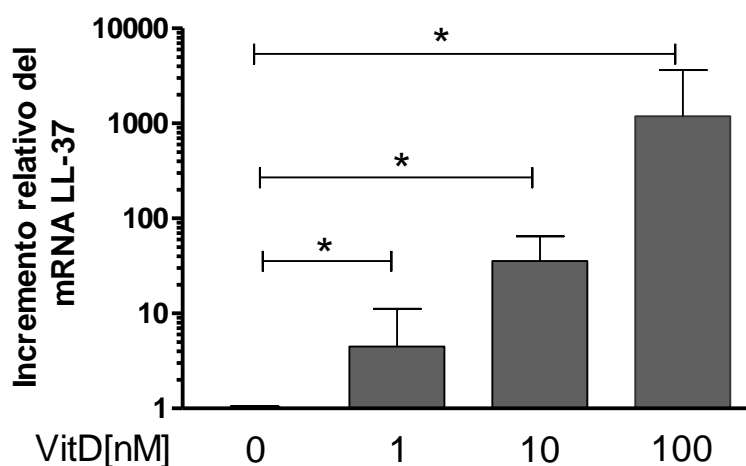


Figura 7. La vitamina D induce la expresión dosis-dependiente del gen LL-37. Los MN de sujetos sanos fueron estimulados con 1, 10 y 100 nM de vitamina D durante 24 horas, se hizo la extracción de RNA total, síntesis de cDNA y se analizó la expresión del gen LL-37 por RT-PCR. Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación estándar (DS), Mann-Whitney ($n=6$) (0 vs 1, 10 y 100nM, $*p < 0.05$)

Expresión de VDR y CYP27B1 en MN tratados con vitamina D

La vitamina D ejerce su función activadora a través de su receptor de vitamina D (VDR), gen que se expresa en células del sistema inmune como MN humanos y macrófagos murinos; la expresión de VDR y tiene un papel en la activación de la transcripción de genes involucrados en la muerte de la *M. tuberculosis*. En macrófagos humanos la activación del TLR1/2 en presencia de la forma activa de la vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D₃) induce la expresión del VDR y la 1 α -hidroxilasa (CYP27B1), quien hidroxila a la 25 hidoxivitamina D en el carbono 1 convirtiéndola en su forma activa lo que conduce a la producción del péptido antimicrobiano LL-37.

Por los antecedentes mencionados se estudió el efecto de las diferentes concentraciones de vitamina D (1, 10 y 100 nM) sobre la transcripción de VDR y CYP27B1 en MN humanos por PCR en tiempo real. En la figura 8A se observa que los MN expresan VDR a medida que aumentó la concentración de vitamina D, sin embargo no es significativo (SE vs 1, 10 y 100nM). Un resultado semejante se observó en la expresión de CYP27B1 en la figura 8B,

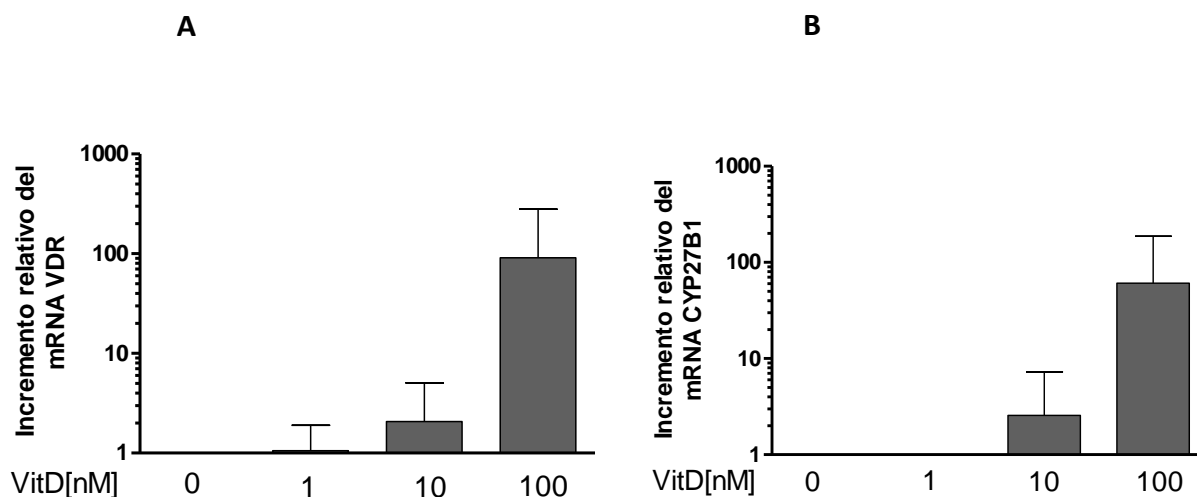


Figura 8. Expresión de VDR y CYP27B1 en MN tratados con vitamina D. Lo MN fueron estimulados 24 horas con vitamina D, se hizo la extracción del mRNA, síntesis de cDNA y analizó la expresión del mRNA de VDR y CYP27B1 por RT-PCR. **(A)** y CYP27B1 **(B)**. Las barras representan la media y las líneas verticales desviación estándar (SD), Mann Whitney, (n=5).

La vitamina D disminuye la expresión del mRNA de TACO

La proteína TACO se encuentra en la membrana del fagosoma y desaparece a medida que se fusiona con el lisosoma. Una de las estrategias de *M. tuberculosis* para sobrevivir dentro del macrófago es evitar la fusión del fagosoma-lisosoma mediante la retención de la proteína TACO, lo cual evita la destrucción de la micobacteria. Por otro lado se ha observado que la vitamina D disminuye la expresión de TACO.

En este trabajo se analizó el efecto de la vitamina D sobre la expresión del mRNA de TACO en MN estimulados con diferentes concentraciones de vitamina D (1, 10 y 100nM) por PCR en tiempo real. En la figura 9 se muestra que la expresión de TACO disminuye a medida que aumenta la concentración de vitamina D, aunque no es significativo (SE VS 1,10 y 100nM)

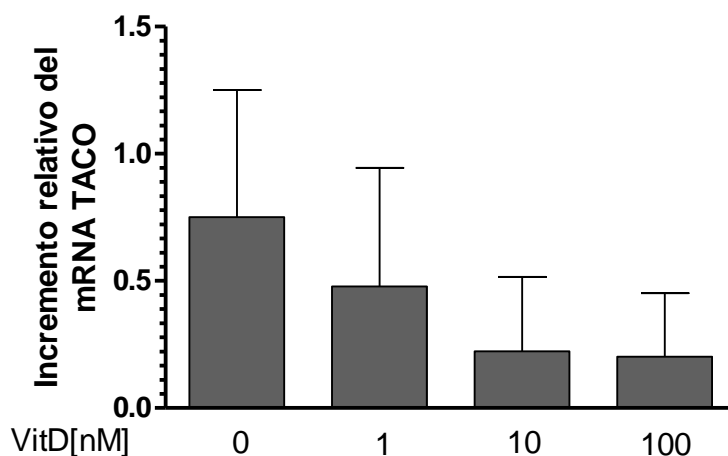


Figura 9. La vitamina D reduce la expresión del mRNA de TACO. Los MN fueron estimulados 24 horas con diferentes concentraciones de vitamina D y se analizó la expresión de mRNA de TACO por RT-PCR. Las barras representan la media y las líneas verticales la desviación estándar (SD), Mann-Whitney, (n=4).

9.DISCUSIÓN

La respuesta inmune innata tiene un papel importante en el control de *M. tuberculosis*, en la cual participan MN y macrófagos. Estas células llevan a cabo fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos iniciando así el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa.

La fagocitosis es un proceso central para la defensa del hospedero en contra de una variedad de microorganismos invasores, que requiere de interacciones específicas entre la superficie de la partícula que va a ser ingerida y las estructuras de reconocimiento de la membrana plasmática del fagocito [60].

La vitamina D es un potente activador de la respuesta inmune ya que regula la diferenciación, crecimiento y función de un amplio rango celular incluyendo células del sistema inmune [27, 29, 30, 37, 46].

En este trabajo se observó un mayor porcentaje a de fagocitosis a MOI 10 en comparación con el MOI de 1 y es independiente de la presencia de vitamina D, demostrando que nuestro sistema funciona de acuerdo a lo reportado [58, 59].

Existen reportes, empleando diferentes condiciones experimentales y tipos celulares, que demuestran que la vitamina D aumenta la capacidad fagocítica de las células del sistema inmune. Tal es el caso de los estudios con la línea celular THP1 y MN de sujetos sanos que fueron tratados con diferentes concentraciones de vitamina D, la cual favoreció la fagocitosis de perlas de látex, *Escherichia coli* y *M. tuberculosis* cepa H37Rv respectivamente [31-33].

Los resultados obtenidos, bajo nuestras condiciones experimentales, demuestran que una concentración de 10 nM de vitamina D, aumenta la capacidad fagocítica de los MN hacia *M. tuberculosis* únicamente a MOI de 10 (figura 3).

Se ha visto que la vitamina D aumenta la expresión de receptores membranales como CD53, CD11d y CD14 en MN y células HL-60 [60, 61]. El receptor CD14 y su interacción con otros TLRs (TLR 4/2) participan en el reconocimiento de patógenos [62].

El efecto de la vitamina D en el incremento de la capacidad fagocítica de los MN podría deberse a que tal vitamina induce la secreción de citocinas importantes para el proceso de fagocitosis (como IL-12), además de que la vitamina D induce la expresión del receptor de manosa (CD206) involucrado en la internalización de *M. tuberculosis* [63, 64]. Se ha descrito que la fagocitosis de *M. tuberculosis* es mediada por el receptor de complemento CR3 (CD11b/CD18) y en

cuanto a los receptores de complemento CR1 (CD35), CR4 (CD11c/CD18) participan en la fagocitosis de distintas especies del género *Mycobacterium* [65, 66].

La observación de que la fagocitosis de *M. tuberculosis*, por MN humanos, se da preferencialmente a una relación de 5 o más micobacterias se debe a la composición propia de la pared de la micobacteria ya que está compuesta por un gran cantidad de lípidos complejos (50-60%) como glicolípidos fenólicos (PGL's), y lipoarabinomanos, que le dan una característica hidrofóbica [67]. Dada esta propiedad, las bacterias difícilmente se encuentran libres y aisladas y en consecuencia son fagocitadas en pequeños grupos como los que se observó en este trabajo (Figura 4-E).

La vitamina D induce la diferenciación y maduración de MN a macrófagos logrando cambiar su forma y tamaño [30]. Este hecho se puede corroborar como lo muestra la figura 5, donde se puede observar que a medida que aumenta la concentración de vitamina D aumentan en tamaño y número de prolongaciones los MN, es decir que van presentando morfologías más hacia macrófago.

Al analizar las diferencias entre los rangos formados según el número de micobacterias que internalizaban, la vitamina D no aumentó la capacidad de fagocitosis de MN que fagocitaron de 1 a 2 y 3 a 4 bacilos, sin embargo el pre-tratamiento con 10 y 100 nM de vitamina D aumentó el potencial fagocítico ($P < 0.05$) del grupo de MN que fagocitaron más de 5 micobacterias (Figura 6).

El mecanismo bactericida en el que participa la vitamina D se basa en la inducción de la producción del péptido LL-37 por parte de las células del sistema inmune innato que está implicado en la muerte directa de *M. tuberculosis*. En este estudio se demostró que la vitamina D induce la expresión de LL-37 en MN humanos de una manera dosis-dependiente ($P < 0.005$) como ya se había demostrado en estudios preliminares [37, 47-49].

La vitamina D al unirse a su receptor VDR (factor de transcripción) y entrar al núcleo dará inicio a la producción de LL-37. Se sabe que la activación de los TLRs de los MN y macrófagos resulta en la producción de VDR y CYP27B1 [37]. El efecto de la vitamina D sobre la expresión de VDR ha sido poco explorado, hasta el momento, únicamente se sabe que en MN murinos la vitamina D aumenta su expresión; sin embargo en este trabajo el efecto de la vitamina D sobre su expresión, empleando MN humanos, no alcanzó una significancia estadística, quizá al aumentar el número de muestras podamos observar cambios significativos.

De acuerdo a los resultados, no se observaron cambios significativos en la expresión del mRNA de VDR y CYP27B1 por efecto de la vitamina D. Es necesario que se explore más a fondo el papel de la vitamina D sobre la expresión de VDR pues se sabe que éste promueve la activación de la autofagia que es un proceso esencial para montar una respuesta inmune efectiva contra *M. tuberculosis* [68].

La supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos se ha asociado a su capacidad de detener o retrasar la maduración del fagosoma. Uno de estos mecanismos es a través de la retención de la proteína TACO en la membrana del fagosoma, que evita que éste madure y con ello se una al lisosoma [56]. Por otro lado se sabe que la vitamina D en conjunto con el ácido retinoico disminuye la expresión de TACO y con ello la maduración del fagosoma y la consecuente eliminación de la micobacteria [57]. Es por ello que se analizó el efecto de la vitamina D en la expresión de TACO en MN.

Los resultados, demuestran que a medida que aumenta la concentración de vitamina D disminuye la expresión de TACO, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas, probablemente si se incrementa el número de muestras podríamos ver significancia estadística y confirmar con lo ya reportado en la literatura. La tendencia que se observó hacia la disminución de la expresión de TACO nos sugiere que la vitamina D está evitando su expresión lo cual podría ser muy importante en el tratamiento y combate de la infección con *M. tuberculosis* ya que favorecería la maduración del fagosoma y por tanto la eliminación de la micobacteria.

Por otro lado se han encontrado elementos de respuesta a VDR/RXR en la región promotora de TACO que están implicados en la de-regulación de TACO [57]. Esto nos dice que en algunos casos el heterodímero VDR/RXR está involucrado en procesos de de-regulación como es TACO y en otros en incrementar la síntesis como es el caso de LL-37.

A nivel *in vitro* existen evidencias de que la vitamina D induce la producción de LL-37 y la disminución de la expresión de TACO en MN y macrófagos, por lo anterior, resulta importante explorar los efectos terapéuticos de la vitamina D en pacientes con TB.

La evidencia clínica adicionando vitamina D en el tratamiento de la TB activa ha sido reportada en pocos estudios. Se ha visto que la administración de vitamina D muestra una diferencia significativa en la conversión del esputo (disminución de carga bacteriana en baciloscopia) comparado con el grupo que se le administró placebo [69]. Así mismo se ha reportado que la vitamina D, administrada a niños con TB activa, disminuye los síntomas clínicos

de la TB en comparación con aquellos que solo se les suministro el tratamiento contra la TB por si sola [70].

Por otro lado se ha visto su papel profiláctico pues se ha demostrado que una única dosis oral de vitamina D potencia la inmunidad en la prevención del desarrollo de TB activa en contactos sanos [71]. Sin embargo existen reportes donde el tratamiento con la vitamina D como coadyuvante a al tratamiento de la TB no representa algún beneficio en la reducción de la severidad clínica de la TB [72].

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo muestran evidencias in vitro de que la vitamina D aumenta la capacidad fagocítica de los MN humanos para *M. tuberculosis* y promueve la producción de LL-37, sin embargo se necesitan más estudios clínicos para acumular más evidencia y apoyar la propuesta del suministro de la vitamina D como coadyuvante para el tratamiento contra la TB.

10. CONCLUSIONES

1. Los MN fagocitan más micobacterias a MOI de 10 en comparación con el MOI de 1 en presencia o ausencia de vitamina D.
2. La vitamina D a una concentración de 10 nM aumenta la fagocitosis total de *M. tuberculosis* por MN, únicamente a MOI de 10.
3. La vitamina D induce la expresión de LL-37 de una manera dosis-dependiente.

11. PERSPECTIVAS

1. Aplicar las concentraciones de 10 y 100 nM de vitamina D y MOI de 10 en un modelo de pacientes con DM2.
2. Evaluar la expresión de receptores que participan en la internalización de *M. tuberculosis* como CD206, CD11b/18 (CR3) y CD11c/18 (CR4) en MN de sujetos sanos bajo estímulo con vitamina D.
3. Evaluar el efecto de la vitamina D en el control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*.

12. REFERENCIAS

1. Cole, S.T., *Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 10): p. 2919-28.
2. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
3. OMS, O.M.d.I.S. *Tuberculosis* 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>.
4. Meena LS, R., *Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. FEBS J., 2010. **277**(11): p. 11.
5. Pieters, J., *Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 399-407.
6. Barrios-Payán Jorge A, C.-A.M., Flores-Valdez Mario A, Hernández-Pando Rogelio . *Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente*. Salud pública de México, 2010. **52**(1): p. 70-78.
7. Ponce-De-Leon, A., et al., *Tuberculosis and diabetes in southern Mexico*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1584-90.
8. Coker, R., et al., *Risk factors for pulmonary tuberculosis in Russia: case-control study*. BMJ, 2006. **332**(7533): p. 85-7.
9. Leung, C.C., et al., *Diabetic control and risk of tuberculosis: a cohort study*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(12): p. 1486-94.
10. Young, F., et al., *Increased risk of tuberculosis disease in people with diabetes mellitus: record-linkage study in a UK population*. J Epidemiol Community Health, 2012. **66**(6): p. 519-23.
11. Dooley, K.E. and R.E. Chaisson, *Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(12): p. 737-46.
12. Salud, S.d., *BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DIABETES MELLITUS TIPO 2 PRIMER TRIMESTRE-2013*, D.g.d. epidemiología, Editor 2013.
13. Kindt J. T., G.R.A., Osborne B.A. , *Inmunología de Kuby*. Sexta ed 2007: McGrawHill.
14. Serbina, N.V., et al., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 421-52.
15. Ziegler-Heitbrock, L. and T.P. Hofer, *Toward a refined definition of monocyte subsets*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 23.
16. Nagy L, S.A., Szatmari I, Széles L., *Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response*. Physiol Rev, 2012. **92**(2): p. 739-789.
17. Zuñiga J, T.-G.D., Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. *Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis*. Clinical and Developmental Immunology, 2012. DOI: 10.1155/2012/193923.
18. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
19. M., M.J.a.B. *Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes*. Current Opinion in Immunology, 2014. **26**, 100-110 DOI: 10.1016/j.coi.2013.11.003.

20. Kindt .T, G.R.y.O., *Inmunología de Kuby*. Sexta ed2007.
21. van Crevel R., O.T., and van der Meer J. , *Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(2): p. 294-309.
22. al.Garrido, e., *Fundamentos de Bioqímica estructural* Segunda ed2006, España
23. AW., N., *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health*. Am J Clin Nutr., 2008. **88**(2): p. 491S-499S.
24. Jäpelt RB, J.J. *Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis*. 2013. **4**, 1-20 DOI: 10.3389/fpls.2013.00136.
25. Baeke F, T.T., Korf H, Gysemans C, Mathieu C., *Vitamin D: modulator of the immune system*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(4): p. 482-496.
26. Norman, A.W. *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health*. 2008. :491S-499S.
27. Selvaraj, P., et al., *Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of vitamin d receptor and cathelicidin in pulmonary tuberculosis*. J Clin Immunol, 2009. **29**(4): p. 470-8.
28. Selvaraj, P., *Vitamin D, vitamin D receptor, and cathelicidin in the treatment of tuberculosis*. Vitam Horm, 2011. **86**: p. 307-25.
29. Rook, G.A., et al., *Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes*. Immunology, 1986. **57**(1): p. 159-63.
30. Crowle, A.J., E.J. Ross, and M.H. May, *Inhibition by 1,25(OH)2-vitamin D3 of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages*. Infect Immun, 1987. **55**(12): p. 2945-50.
31. Xu H, S.A., Gieseler RK, Peters JH., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes*. Scand J Immunol. , 1993. **38**(6): p. 535-540.
32. Schwende H, F.E., Ambs P, Dieter P., *Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3*. J Leukoc Biol. , 1996. **59**(4): p. 555-561.
33. Chandra, G., et al., *Effect of vitamin D3 on phagocytic potential of macrophages with live Mycobacterium tuberculosis and lymphoproliferative response in pulmonary tuberculosis*. J Clin Immunol, 2004. **24**(3): p. 249-57.
34. Gilaberte Y., A.J., Carrascosa M., Figueroa F., RomanídeGabriel J. and Nagore E. , *La vitaminaD:evidencias y controversias*. Actas Dermosifiliogr, 2012. **102**(8): p. 572-588.
35. Nnoaham, K.E. and A. Clarke, *Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. Int J Epidemiol, 2008. **37**(1): p. 113-9.
36. Hernández Sánchez F., H.B.M.a.T.R.M., *Papel de la vitamina D en la infección con Mycobacterium tuberculosis: Evidencias en torno a su papel protector*. Neumol Cir Torax,, 2011. **70**(4): p. 252-260.
37. Liu, P.T., et al., *Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response*. Science, 2006. **311**(5768): p. 1770-3.
38. Sung CC, L.M., Lu KC, Wu CC. *Role of Vitamin D in Insulin Resistance*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012. DOI: doi:10.1155/2012/634195.
39. Pittas, A.G., et al., *Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women*. Diabetes Care, 2006. **29**(3): p. 650-6.
40. Gombart, A.F., et al., *Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)2D3 in various tissues*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **103**(3-5): p. 552-7.
41. M, H., *Vitamin D and the intracrinology of innate immunity*. Mol Cell Endocrinol., 2010. **321**(2): p. 103-111.

42. Veldman, C.M., M.T. Cantorna, and H.F. DeLuca, *Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system*. Arch Biochem Biophys, 2000. **374**(2): p. 334-8.
43. Vandamme, D., et al., *A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide*. Cell Immunol, 2012. **280**(1): p. 22-35.
44. Bucki, R., et al., *Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(1): p. 15-25.
45. Rivas-Santiago B. Sada E., H.-P.a.T.V., *Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas*. Salud Publica Mex, 2006. **48**(8): p. 62-71.
46. Rivas-Santiago, B., et al., *Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells*. Infect Immun, 2008. **76**(3): p. 935-41.
47. Wang TT, N.F., Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH., *Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression1*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2909-2912.
48. Martineau, A.R., et al., *IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7190-8.
49. Liu PT, S.S., Tang DH, Modlin RL., *Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against Mycobacterium tuberculosis Is Dependent on the Induction of Cathelicidin1*. J Immunol, 2007. **179**(4).
50. Hewison, M., *Vitamin D and the intracrinology of innate immunity*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **321**(2): p. 103-11.
51. Oren, Z., et al., *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, 1999. **341 (Pt 3)**: p. 501-13.
52. Moulder, J.W., *Comparative biology of intracellular parasitism*. Microbiol Rev, 1985. **49**(3): p. 298-337.
53. Meena, L.S. and Rajni, *Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. FEBS J, 2010. **277**(11): p. 2416-27.
54. Ferrari, G., et al., *A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria*. Cell, 1999. **97**(4): p. 435-47.
55. Hasan, Z., et al., *Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway*. Mol Microbiol, 1997. **24**(3): p. 545-53.
56. Anand PK, K.D., *Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription*. Biochem Biophys Res Commun. , 2003. **310**(3): p. 876-877.
57. Anand PK, K.D., *Downregulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages*. FEMS Microbiol Lett., 2005. **250**(1): p. 137-144.
58. Fine-Coulson K, R.B., Karls RK, Quinn FD *The Role of Lipid Raft Aggregation in the Infection of Type II Pneumocytes by Mycobacteriu tuberculosis*. PLoS ONE, 2012 **7**(9): p. e45028.
59. Welin A, E.D., Stendahl O, Lerm M *Human Macrophages Infected with a High Burden of ESAT-6-Expressing M. tuberculosis Undergo Caspase-1- and Cathepsin B-Independent Necrosis*. PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. 10.1371/journal.pone.0020302.
60. Spittler, A., et al., *Effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood*

- monocytes and U937 cells: role in cell differentiation, activation and phagocytosis.* Immunology, 1997. **90**(2): p. 286-93.
61. Ober-Blobaum, J.L., et al., *Cadmium ions promote monocytic differentiation of human leukemia HL-60 cells treated with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3.* Biol Chem, 2010. **391**(11): p. 1295-303.
 62. Thomas, L., et al., *The N-terminus of CD14 acts to bind apoptotic cells and confers rapid-tethering capabilities on non-myeloid cells.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70691.
 63. Piemonti L, M.P., Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, Allavena P, Di Carlo V., *Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells.* J Immunol. , 2000. **164**(9): p. 4443-4451.
 64. Schlesinger, L.S., *Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors.* J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2920-30.
 65. Schlesinger, L.S., et al., *Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3.* J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2771-80.
 66. Schlesinger, L.S. and M.A. Horwitz, *Phagocytosis of Mycobacterium leprae by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium.* J Immunol, 1991. **147**(6): p. 1983-94.
 67. Gorocica P., J.-M.M., Garfias y., Sada L. y Lascurain R. , *Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis.* Rev. Ins Nal. Enf. Resp. Mex, 2005. **18**(2): p. 142-153.
 68. Jo, E.K., *Autophagy as an innate defense against mycobacteria.* Pathog Dis, 2013. **67**(2): p. 108-18.
 69. Dini, C. and A. Bianchi, *The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases.* Ann Ist Super Sanita, 2012. **48**(3): p. 319-27.
 70. Yamshchikov, A.V., et al., *Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials.* Endocr Pract, 2009. **15**(5): p. 438-49.
 71. Martineau, A.R., et al., *A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(2): p. 208-13.
 72. Wejse, C., et al., *Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(9): p. 843-50.

ANEXO

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

1. 1L de solución salina fostatada (PBS) al 0.01 M. pH 7.2 Biowhittaker)
2. 5g de albúmina sérica bovina Fraccion V (Calbiochem)
3. 4mL de solución EDTA 0.5 M (Gibco)
4. Equipo de filtración 1L 0.22 μ m (Corning)

En un matraz llenar con 900 mL de PBS en el cual se le agrega 5 g de BSA y 4 mL de EDTA 0.5M una vez disuelto y se lleva a un volumen final de 1000mL. Filtrar con equipo de filtrado en la campana de flujo laminar. Etiquetar y almacenarlo a 4 °C.

Preparación de la DNasa

En un tubo mezclar suavemente 10 μ L de la solución madre de DNAsal (Quiagen) y 70 μ L del buffer de digestión de ADN (RDD)(Quiagen). La solución se prepara de acuerdo al número de muestras. Por ejemplo, se mezcla 100 μ L de DNAsa I con 700 μ L del buffer de digestión para 10 muestras.

Síntesis de cDNA complementario

Preparación de la mezcla RNA/Primer agregando los reactivos en el siguiente orden:

Componente	Muestra	+RT control
5 μ g RNA total	8 μ L	-
RNA control (50ng/ μ L)	-	1 μ L
Randomhexamers (50ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L
Mezcla 10nM dNTP	1 μ L	1 μ L
Agua-DEPC	-	1 μ L
Volumen Final	10 μ L	10 μ L

Preparación de la reacción RT agregando los componentes en el orden indicado, las cantidades varían según el número de reacciones

Componente	Por reacción
10X RT buffer	2 μ L
25mM MgCl ₂	4 μ L
0.1 M DTT	2 μ L
RNaseOUTrecombinantribonucleasainhibitor	1 μ L
Volumen final	9 μ L

Análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa

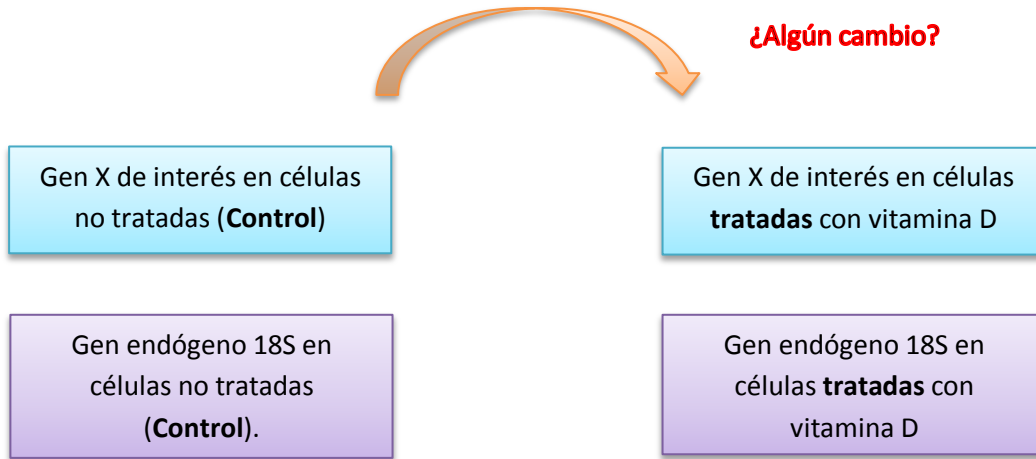
Mezcla master Mix para expresión de genes agregar los siguientes componentes haciendo el cálculo para el número total de muestras que se tienen.

Agua DEPC 5 μ L	5 μ L
2X Universal Master MixTaqMan*	10 μ L
Ensayo 20X	1 μ L
Volumen final	16 μ L

*Esta mezcla contiene la enzima DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, cloruro de magnesio (MgCl₂) y los desoxirribonucleósidos-trifosfato dTTP, dATP, dCTP y dGTP

Cuantificación de la expresión génica fórmulas utilizadas en el método $\Delta\Delta Ct$

1. Normalización



$$\Delta Ct1 = Ct (\text{del gen X tratadas}) - Ct (\text{del gen 18S tratadas})$$

$$\Delta Ct2 = Ct (\text{del gen X control}) - Ct (\text{del gen 18S control})$$

2. Obtención de RQ (Unidades de expresión relativa)

Número de veces que el transcrito se expresa en relación al control.

$$\Delta Ct1 - \Delta Ct2 = \Delta\Delta Ct$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = RQ$$