



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la hiperglucemia *in vitro* en la expresión de LL-37 inducido por la vía del metabolismo de la vitamina D (25(OH)D3) en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* en monocitos de sujetos sanos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VICTOR ADRIAN LUNA MORALES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. YOLANDA GONZALEZ HERNANDEZ**

Ciudad Universitaria, CDMX., 2017



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre (s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Subtítulo
Número de paginas
Año

1. Datos del alumno

Luna
Morales
Victor Adrián
58 12 51 30
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309220374

2. Datos del tutor

Dra.
Yolanda
González
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Adolfo
Andrade
Cetto

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Teresa
Herrera
Barrios

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Luis Horacio
Gutiérrez
González

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Esmeralda
Juárez
Carvajal

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la hiperglucemia *in vitro* en la expresión de LL-37 inducido por la vía del metabolismo de la vitamina D (25(OH)D3) en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* en monocitos de sujetos sanos.

71 p
2017

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora de tesis, Dra. Yolanda González Hernández.

A la Dra. Martha Torres Rojas.

A los voluntarios involucrados en el desarrollo experimental de esta investigación.

A cada investigador, enfermera y personal del
Departamento de Investigación en Microbiología del INER,
por su asistencia en el desarrollo experimental de esta investigación.

A mis sinodales:

Dr. Adolfo Andrade Cetto

Dra. María Teresa Herrera Barrios

Dr. Luis Horacio Gutiérrez González

Dra. Esmeralda Juárez Carvajal.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
“Ismael Cosío Villegas”.

A mi familia.

Compañeros y profesores.

A la Escuela Nacional Preparatoria No. 4
“Vidal Castañeda y Nájera”.

A la Facultad de Ciencias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

	CONTENIDO	PÁGINA
	ABREVIATURAS	
	RESUMEN	
	1. ANTECEDENTES.	
	1.1. Tuberculosis pulmonar (TBP).	1
	1.2. Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).	3
	1.3. La DM2 como factor de riesgo para el desarrollo de TBP.	5
	1.4. La vitamina D como complemento en el tratamiento de TBP.	7
	1.5. Calcidiol: precursor de la vitamina D.	8
	1.6. Metabolismo de la vitamina D.	11
	1.7. Mecanismos bactericidas inducidos por la vitamina D en monocitos.	16
	1.8. DM2 y el control de <i>M. tuberculosis</i> dependiente de la vitamina D.	23
	2. JUSTIFICACIÓN.	25
	3. HIPÓTESIS.	27
	4. OBJETIVOS.	27
	5. MATERIAL Y MÉTODOS.	
	5.1. Reclutamiento de voluntarios y muestras biológicas.	29
	5.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica por gradiente de densidad.	29
	5.3. Purificación de monocitos por selección positiva.	30
	5.4. Ensayo de hiperglucemia <i>in vitro</i> .	32
	5.5. Extracción de ARNm.	34
	5.6. Síntesis de ADNc por transcripción reversa.	35
	5.7. Análisis de expresión de genes por PCR Tiempo Real y cuantificación relativa.	36
	5.8. Análisis estadísticos.	38
	6. RESULTADOS.	41
	7. DISCUSIÓN.	51
	8. CONCLUSIÓN.	55
	9. REFERENCIAS.	57
	10. ANEXOS.	67

ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D ₂	Ergocalcitrinol o calcitriol vegetal (1 α ,25-Dihidroxi-ergocalciferol).
1,25(OH) ₂ D ₃	Colecalcitrinol o calcitriol animal (1 α ,25-Dihidroxi-colecalciferol).
25(OH)D ₂	Ergocalcidiol o calcidiol vegetal (25-Hidroxi-ergocalciferol).
25(OH)D ₃	Colecalcidiol o calcidiol animal (25-Hidroxi-colecalciferol).
7DC	7-Dehidro-Colesterol.
ADN (DNA)	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>).
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario.
AF-2	Dominio 2 de Activación de Función Transcripcional (<i>Activation Function 2</i>).
AMP	Péptido Antimicrobiano (<i>Antimicrobial Peptide</i>).
ARN (RNA)	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>).
ARNm (mRNA)	Ácido Ribonucleico mensajero (<i>messenger Ribonucleic Acid</i>).
BSA	Albúmina de Suero Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>).
CAMP	Péptido Antimicrobiano Catelicidina (<i>Cathelicidin Antimicrobial Peptide</i>).
CD14	Cúmulo de diferenciación de células mielomonocíticas.
CYP24A1	Citocromo P450 25-OH-D-24-hidroxilasa.
CYP24A-SV	Variante de Empalme de CYP24A (<i>CYP24A Splice Variant</i>).
CYP27A1	Citocromo P450 vitamina-D-25-hidroxilasa.
CYP27B1	Citocromo P450 25-OH-D-1 α -hidroxilasa.
DBP	Proteína de Unión a la vitamina D (<i>vitamin D-Binding Protein</i>).
DEPC	<i>Diethyl-pyrocaborate</i> .
DM	Diabetes Mellitus.
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1.
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2.
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados.
DRIP	Proteína de Interacción con el Receptor de vitamina D (<i>vitamin D Receptor Interacting Protein</i>).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>).
FGF-23	Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>).
GB-ID	<i>GenBank ID</i> .
GLUT-4	Transportador de Glucosa tipo 4 (<i>Glucose Transporter type 4</i>).
hCAP18	Proteína Antimicrobiana Catelicidina o Catiónica humana de 18kDa (<i>human Cationic/Cathelicidin Antimicrobial Protein</i>).
IU-VD	Unidades Internacionales de Vitamina D.
LBD	Dominio de Unión al Ligando (<i>Ligand Binding Domain</i>).

<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos (<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>).
PBMC	Célula Mononuclear de Sangre Periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>).
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>).
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PDB-ID	<i>Protein Data Bank ID</i> .
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones (<i>Pattern Recognition Receptor</i>).
PTH	Hormona Paratiroidea (<i>Parathyroid Hormone</i>).
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcripción Reversa (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>).
RXR	Receptor Retinoide X (<i>Retinoid X Receptor</i>).
SBF	Suero Fetal Bovino.
TB	Tuberculosis.
TBL	Tuberculosis Latente.
TBP	Tuberculosis Pulmonar.
TFIIB	Factor de Transcripción II B (<i>Transcription Factor II B</i>).
TLR	Receptor Tipo Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>).
UVB	Radiación Ultravioleta B.
VDR	Receptor de Vitamina D (<i>Vitamin D Receptor</i>).
VDRE	Elemento de Respuesta a Vitamina D (<i>Vitamin D Responsive Element</i>).

RESUMEN

Introducción. Desde hace décadas, la suplementación con vitamina D se ha considerado como una opción de complemento al tratamiento farmacológico en pacientes con tuberculosis (TB). Aunque existe un tratamiento efectivo contra la TB, su control ha sido difícil debido a la comorbilidad con enfermedades que afectan el sistema inmune, principalmente la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Entre los mecanismos de la susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* en pacientes con DM2 están las acciones dependientes de la vitamina D, puesto que se ha reportado que la expresión del receptor de vitamina D (VDR) y del péptido antimicrobiano LL-37 se encuentran disminuidas respecto a sujetos sanos. Para que LL-37 se induzca por una vía dependiente de la vitamina D, es necesario que los monocitos reconozcan patógenos como *M. tuberculosis* a través de los receptores tipo Toll (TLR) para inducir la expresión de la enzima CYP27B1 y del VDR. La CYP27B1 convierte al precursor 25(OH)D₃ en la forma activa de la vitamina D (1,25(OH)₂D₃), que forma un complejo con VDR para traslocarse al núcleo e inducir la expresión del ARNm de LL-37.

Objetivo. Evaluar el efecto de las altas concentraciones de glucosa en la expresión del ARNm de los genes CYP24A1, CYP27B1, VDR y LL-37 durante la infección con *M. tuberculosis* en monocitos de sujetos sanos.

Material y métodos. Se separaron monocitos CD14⁺ por selección positiva a partir de sangre periférica de sujetos sanos. 1x10⁶ monocitos fueron incubados *in vitro* en medio de cultivo conteniendo 5.5 mM (99 mg/dL), 15 mM (270 mg/dL) o 30 mM (540 mg/dL) de D-Glucosa + 10% SFB durante 22 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después del tiempo de incubación con glucosa, los monocitos fueron infectados con *M. tuberculosis* (MOI 1:1) y estimulados con el precursor de la vitamina D, 25(OH)D₃ (10 nM), durante 22 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron lisadas con buffer RLT para aislar el ARN mensajero (ARNm) con columna de sílica. Con el ARNm como templado se realizó la síntesis del ADN

complementario (ADNc) por transcripción reversa. El ADNc se utilizó para la amplificación de los genes de CYP24A1, CYP27B1, VDR y LL-37 por PCR en tiempo real (qPCR). Los cambios en la expresión génica fueron reportados con el método de CT comparativo ($\Delta\Delta CT$) y analizados con la prueba de ANOVA de Friedman y Dunn.

Resultados. Los datos mostraron que la hiperglucemia *in vitro* con glucosa 15 y 30 mM no indujo la expresión del ARNm de CYP24A1, CYP27B1, VDR y LL-37. Los monocitos incubados con glucosa 30 mM, estimulados con el precursor de la vitamina D 25(OH)D₃ (10 nM) e infectados con *M. tuberculosis* (MOI 1:1), no indujeron la expresión de la enzima CYP27B1 y del receptor VDR.

Conclusión. En condiciones de hiperglucemia 30 mM, la infección con *M. tuberculosis* no induce la expresión del ARNm de CYP27B1 y VDR en monocitos humanos. Ésto sugiere una deficiencia tanto en la conversión del precursor de la vitamina D a su forma activa (1,25(OH)₂D₃), como en la inducción de LL-37 dependiente de 1,25(OH)₂D₃, en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, lo cual incrementa la susceptibilidad al desarrollo de TBP en pacientes con DM2 con un control deficiente de la hiperglucemia.

1. ANTECEDENTES

1.1. Tuberculosis pulmonar (TBP).

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que 10.4 millones de personas en el mundo enfermaron de TB y 1.8 millones murieron por esta enfermedad en 2015. Aunque la incidencia de este padecimiento ha disminuido 1.5% anual desde el año 2000 aún es una enfermedad de difícil control. En México la prevalencia es menor (17.55) que la incidencia, la cual se ha mantenido en 21 por cada 100 000 habitantes (OMS, 2016).

Aunque la infección (TB) puede afectar diferentes órganos, la TB pulmonar (TBP) es la forma clínica más común y se transmite de persona a persona cuando los pacientes tosen o estornudan, puesto que liberan gotas de saliva microscópicas que contienen a *M. tuberculosis*, las cuales pueden permanecer suspendidas en el medio ambiente por largos períodos debido a las características de la envoltura de la bacteria. Posteriormente, el bacilo ingresa al cuerpo humano vía respiratoria y se propaga desde el sitio de infección inicial a través de los vasos linfáticos o sanguíneos hacia el vértice y ganglios linfáticos pulmonares (Ocampo Cifuentes, 2014).

M. tuberculosis, un patógeno intracelular de replicación lenta, está compuesto por una membrana plasmática, una pared celular y una capa similar a una cápsula exterior que interactúa directamente con los elementos de la respuesta inmune. Entre los antígenos que activan la respuesta inmune se encuentran los derivados de los fosfolípidos altamente glicosilados, como el lipoarabinomanano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB (Gorocica et al., 2005; Ocampo Cifuentes, 2014).

La respuesta inmune es eficiente para prevenir el desarrollo de la enfermedad activa, sin embargo, no es capaz de eliminar a las micobacterias y en el 90% de los casos *M. tuberculosis* puede persistir dentro del sujeto por muchos años sin causar enfermedad en un estado conocido como TB latente (TBL), estimado en una tercera parte de la población mundial (González Hernández et al., 2009; OMS, 2016). El riesgo de presentar una reactivación de la infección latente y desarrollar TB activa es más probable cuando se presenta algún factor que afecta la inmunocompetencia de los sujetos, como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (González Hernández et al., 2009; Ocampo Cifuentes, 2014).

1.2. Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por defectos en la secreción y/o acción de la insulina que derivan en hiperglucemia (González Hernández et al., 2009; Schuster & Duvuuri, 2002), siendo la tipo 1 (DM1 o de inicio en la infancia; autoinmune o idiopática) y tipo 2 (DM2 o de inicio en la edad adulta) las de mayor frecuencia (López Sigüero & Pino, 2003; Skelly, 2006).

De acuerdo al informe sobre la diabetes de la OMS, 422 millones de adultos en todo el mundo padecían la enfermedad durante 2014. En México, la DM afecta al 10.4% de la población adulta y es considerada como una epidemia (González Hernández et al., 2009; OMS, 2016), siendo diagnosticada la DM2 en el 90% de los casos (González Hernández et al., 2009; Pittas & Dawson Hughes, 2010; Skelly, 2006). El número de individuos con DM2 está aumentando, incluso en la población infantil y adolescente, debido al crecimiento poblacional, la etnicidad, el sedentarismo y principalmente la obesidad (Maciel Griz et al., 2014; Skelly, 2006).

En un individuo normoglucémico, las células β pancreáticas, de los islotes de Langerhans, sintetizan y secretan insulina en respuesta a un aumento en los niveles de glucosa en sangre. La insulina es una hormona polipeptídica que promueve los insumos de glucosa y la síntesis de glucógeno, proteínas y triglicéridos. El transportador-4 de glucosa (GLUT-4) es responsable del suministro de esta molécula en los tejidos, llevando sus niveles en sangre a 3.9–5.8 mmol/L. La condición de hiperglucemia, en individuos con DM1, se debe a una deficiencia absoluta de insulina por la destrucción de las células β pancreáticas (Moreira & Hamadeh, 2010; Wolden Kirk et al., 2011).

En individuos con DM2 la sensibilidad tisular a la insulina está disminuida, aunque la masa funcional y la habilidad secretora de las células β pueden estar comprometidas, lo que deriva en una deficiencia relativa de la hormona (Moreira &

Hamadeh, 2010; Wolden Kirk et *al.*, 2011). El defecto en el procesamiento de la proinsulina en las células β pancreáticas, el incremento en la concentración del polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos y la acelerada gluconeogénesis hepática, en personas con predisposición genética a desarrollar DM2, contribuyen al desarrollo de hiperglucemia, estableciéndose una glucemia en ayunas mayor a 126 mg/dL (7 mmol/L) (OMS, 2016; Wolpowitz & Gilcrest, 2006).

1.3. La DM2 como factor de riesgo para el desarrollo de TBP.

La DM es una enfermedad que ha venido en progreso convirtiéndose en una pandemia, por lo que la OMS ha identificado a este padecimiento como un factor de riesgo en la emergencia de TB, principalmente en países donde ambas condiciones son endémicas, como ocurre en México, donde la DM2 es el tipo más frecuente y representa hasta el 22% de los casos de TB, con un riesgo a desarrollar la infección de 1.8 a 8 veces mayor con respecto a la población no diabética, particularmente en aquellos pacientes con un control deficiente de la enfermedad (González Hernández et al., 2009; López López et al., 2014; Restrepo & Schlesinger, 2013).

Además de las condiciones ambientales, las condiciones socioeconómicas de la población con DM influyen en la incidencia de TB. Se ha encontrado que la asociación DM-TB es mayor en poblaciones fronterizas donde se observa un gran hacinamiento (González Hernández et al., 2009).

Los pacientes con DM parecen tener más probabilidades de desarrollar TBP con más cavitaciones. Teniendo en cuenta que las cavidades pulmonares están asociadas con altas cargas bacterianas en el esputo, los pacientes con DM-TB pueden ser importantes contribuyentes del contagio. Así mismo, la DM puede afectar la presentación y el curso clínico de la TB, con un riesgo de muerte de 6.5 a 6.7 veces mayor en pacientes con DM-TB comparado con pacientes sólo con TB (López et al., 2012; Restrepo & Schlesinger, 2013).

Los bajos niveles de vitamina D se han asociado con un incremento en el riesgo al desarrollo de DM2 (Borges et al., 2011; Maciel Griz et al., 2014). Adicionalmente, estudios epidemiológicos de casi 30 años han demostrado una vinculación entre la insuficiencia de vitamina D ($25(\text{OH})\text{D} < 75 \text{ nmol/L}$) y la deficiencia en la actividad antimicrobiana en monocitos/macrófagos, lo cual afecta la progresión de TB

activa en humanos (Gombart, 2009; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011; White, 2008).

Además de la deficiencia de vitamina D, en pacientes con DM la hiperglucemia es un factor importante en la susceptibilidad a TB, puesto que se ha sugerido que esta condición afecta la activación de genes importantes en la respuesta inmune innata, como la inducción de péptidos antimicrobianos, necesarios para el control de patógenos bacterianos (Boillat Blanco et al., 2016; Restrepo & Schlesinger, 2013).

1.4. La vitamina D como complemento en el tratamiento de TBP.

Desde 1840, los recursos ambientales (helioterapia) y alimenticios de vitamina D han sido identificados como tratamiento alternativo en individuos con TB (Blanco Quirós et al., 2009). A partir de 1930, la vitamina D fue empleada en complemento al tratamiento farmacológico como una posible estrategia de combate a la TB (Gombart, 2009; Güerri Fernández et al., 2009; Hernández Sánchez et al., 2011; Selvaraj, 2011; White, 2012).

La prevalencia de TB en poblaciones con déficit del precursor de vitamina D (calcidiol 25(OH)D) no ha podido establecerse con claridad, debido a la complejidad de las variables que se asocian con la susceptibilidad a la infección y que incluyen de forma importante la variabilidad genética, en especial a nivel del receptor de vitamina D (VDR), mediador entre la concentración de la molécula y sus efectos celulares (Gombart, 2009; Hernández Sánchez et al., 2011; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011).

Estudios poblacionales mencionan que algunas variables polimórficas del VDR favorecen o protegen contra el desarrollo de la TB. Sin embargo, los niveles de vitamina D que difieren con respecto a la ubicación geográfica (exposición latitudinal a la luz solar) y otras condiciones (físicas y culturales), pueden favorecer o disminuir el efecto de los polimorfismos, lo cual explicaría la heterogeneidad de los resultados (Hernández Sánchez et al., 2011; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011).

El uso de vitamina D como suplemento en el tratamiento con antibióticos es una estrategia que ya ha comenzado a explorarse y que ha resultado favorable para algunos fondos genéticos en la reducción de la severidad clínica de la infección, demostrando mejoras radiológicas (disminución del daño pulmonar) y reducción en la carga bacteriana del esputo en pacientes con TBP (Hernández Sánchez et al., 2011; Selvaraj, 2011).

1.5. Calcidiol: precursor de la vitamina D.

Las vitaminas son compuestos orgánicos requeridos en la dieta, por lo que no pueden ser sintetizados en cantidades suficientes por el organismo (Selvaraj, 2011).

Sin embargo, el organismo humano es capaz de sintetizar al metabolito 25(OH)D o calcidiol (25(OH)D₂ + 25(OH)D₃) circulante en sangre, precursor y marcador de los niveles de vitamina D (Baeke et al., 2008; Maciel Griz et al., 2014). El calcidiol debe encontrarse a una concentración recomendada entre 28–32 ng/mL (70–80 nmol/L), mientras la deficiencia de vitamina D está definida por valores menores a 20 ng/mL (50 nmol/L) (Hernández Sánchez et al., 2011; White, 2008).

El mantenimiento de las concentraciones normales del precursor de la vitamina D en adultos e infantes se consigue generalmente a través de la exposición del 15% del cuerpo (rostro, brazos y manos) a la luz solar dos horas por semana, el equivalente a una ingesta de 1000 IU/día (1 IU VD = 0.025 µg) o 25 µg/día de 25(OH)D (Baeke et al., 2008; Tourkey & Abdul Aziz, 2010). Las fuentes importantes de vitamina D son el pescado graso (sardina, atún, salmón, arenque) o sus aceites de hígado (fletán). En Norte América y México, la leche líquida y en polvo, la margarina, mantequilla y ciertos cereales, son suplementados con vitamina D₂ y vitamina D₃ (**Tabla 1**), aunque no siempre cubren los requerimientos diarios de vitamina D. De acuerdo a la ingesta dietética actual de referencia, los niños y adultos jóvenes deben ingerir 5 µg (200 IU/día) de calcidiol, 10 µg (400 IU/día) los adultos entre 51–79 años de edad, y 15 µg (600 IU/día) las personas mayores de 70 años (Baeke et al., 2008).

Debido a que el 50–90% del precursor de la vitamina D es obtenido de la síntesis en la piel, su deficiencia no se debe solamente a la desnutrición, sino también a las condiciones naturales del organismo, variaciones genéticas y hábitos alimenticios (Hernández Sánchez et al., 2011). La cantidad de calcidiol en sangre

depende principalmente de la exposición a la luz solar, influenciada por las condiciones geográficas (latitud, estacionalidad y etnicidad), físicas (pigmentación cutánea, edad, embarazo y comorbilidades) y culturales, sin importar el nivel de desarrollo poblacional (Henry, 2011; López López et al., 2014; White, 2012).

En ausencia de suplementación, el calcidiol es obtenido naturalmente de un número limitado de recursos cuya ingesta puede ser inadecuada en algunas dietas, incluyendo el vegetarianismo, veganismo estricto o dietas macrobióticas que emplean sustitutos de leche, como la soya o leche de almendras, lo cual conduce a hipovitaminosis D, condición que se vuelve más probable si la exposición a la radiación solar es incorrecta (Tourkey & Abdul Aziz, 2010; White, 2012; White, 2008).

Adicionalmente, se ha observado que pacientes obesos tienen bajos niveles séricos de calcidiol (25(OH)D) debido a que se encuentra solubilizado en el interior de los adipocitos (Hernández Sánchez et al., 2011), lo cual puede alterar el metabolismo del precursor de vitamina D en conjunto con las condiciones genéticas (polimorfismos) del organismo (Tourkey & Abdul Aziz, 2010).

Tabla 1. Alimentos que naturalmente contienen al precursor (25(OH)D) de la vitamina D2 (ergocalcidiol) y D3 (colecalcidiol) (Modificado de Cavalier et al., 2011).

Alimento	Contenido (IU/100g)	Contenido (µg/100g)
Aceite de hígado de fletán (D3)	200000	5000
Hígado de bacalao (D3)	8500	212.5
Anguila de mar (D3)	520	13
Anguila de río ahumada (D3)	3600	90
Bacalao (D3)	50	1.25
Fletán (D3)	200	5
Fletán negro (D3)	600	15
Arenque (D3)	1250	31.25
Lubina (D3)	20	0.5
Jurel (D3)	40	1
Sardina (D3)	300	7.5
Salmón (D3)	650	16.25
Salmón enlatado (D3)	450	11.25
Pescado rojo (D3)	90	2.25
Platija (D3)	60	1.5
Atún (D3)	200	5
Ostra (D3)	300	7.5
Mantequilla (D3)	50	1.25
Margarina (D3)	300	7.5
Crema Francesa (D3)	40	1
Hígado de ternero (D3)	130	3.25
Hígado de ave de corral (D3)	50	1.25
Leche (D3)	1	0.025
Queso (D3)	10	0.25 - 0.5
Huevo (D2 y D3)	70	1.75
Yema Líquida (D2 y D3)	220	5.5

1.6. Metabolismo de la vitamina D.

Vitamina D (calciferol) es el nombre genérico para un grupo de esteroides lipofílicos derivados del 7-dehidro-colesterol (7DC o pro-vitamina D), presente en grandes cantidades en las membranas de las células epidérmicas (Baeke et *al.*, 2008; Hernández Sánchez et *al.*, 2011), siendo las formas principales la pre-vitamina D₂ (ergocalciferol) de origen vegetal y la pre-vitamina D₃ (colecalfiferol) de origen animal, a partir de las cuales se sintetiza el ergocalcidiol (25(OH)D₂) y el colecalfidiol (25(OH)D₃), respectivamente (Henry, 2011; Maciel Griz et *al.*, 2014).

En el humano, la síntesis del metabolito activo inicia en las células epidérmicas (Henry, 2011) con la transformación del 7DC durante la exposición de la piel a los rayos ultravioleta de longitud de onda intermedia (330 nm, franja UVB del espectro), que rompe fotoquímica y térmicamente al sistema de anillos del 7DC formando pre-vitamina D₃ colecalfiferol, la cual es rápidamente isomerizada por energía térmica en el metabolito circulante colecalfiferol (**Figura 1**) (Baeke et *al.*, 2008; Henry, 2011; Maciel Griz et *al.*, 2014).

Los secosteroides liposolubles colecalfiferol y ergocalciferol, son transportados al hígado desde su sitio de síntesis, o absorción, por la proteína acarreadora de unión a vitamina D (DBP). En el hígado, la enzima vitamina-D-25-hidroxilasa (CYP27A1) mitocondrial adiciona un grupo hidroxilo en el carbono 25 (Maciel Griz et *al.*, 2014; Wolpowitz & Gilchrest, 2006), generando al metabolito precursor 25(OH)D o calcidiol, que tiene una vida media de aproximadamente dos a cuatro semanas (Cavalier et *al.*, 2011; Hernández Sánchez et *al.*, 2011). Posteriormente, el precursor 25(OH)D es transportado por la DBP hasta los riñones donde la enzima 25-OH-D-1 α -hidroxilasa (CYP27B1; GB-ID: 1594; UniProt-ID: O15528; **Anexo 10.1.**) mitocondrial, en los túbulos renales proximales, adiciona un segundo grupo hidroxilo en el carbono 1, produciendo la hormona y metabolito activo 1,25(OH)₂D o calcitriol, con una vida media de cuatro horas (**Figura 2**) (Cavalier et *al.*, 2011; Hernández Sánchez et *al.*, 2011; White, 2012).

Debido a que la actividad prolongada del calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) puede conducir a hipercalcemia y nefrocalcinosis (Dusso et al., 2015), la desactivación de la vitamina D es requerida y ocurre por dos vías catabólicas que involucran a la 25-OH-D-24-hidroxilasa (CYP24A1; GB-ID: 1591; UniProt-ID: Q07973; PDB-ID: 3K9V; 3K9Y; **Anexo 10.1.**), inducida por calcitriol: la vía de oxidación del carbono 24 de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, generando 1,24,25-trihidroxivitamina D y posteriormente el catabolito biliar ácido calcitroico, y el catabolismo de la $25(\text{OH})\text{D}$ en 24,25-dihidroxivitamina D, limitando de sustrato a CYP27B1, enzima cuya expresión puede ser reprimida por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para autorregular negativamente su producción (**Figura 2**) (Gombart, 2009; Prosser & Jones, 2004).

La deficiencia de vitamina D durante la enfermedad renal crónica, por la pérdida en la actividad 1α -hidroxilasa (Inda Filho & Melamed, 2013; Prosser & Jones, 2004; Williams et al., 2009), se considera un factor de riesgo en el desarrollo de padecimientos cardiovasculares como la DM (Levin & Li, 2005; Nakashima et al., 2016; Xiao et al., 2016). Sin embargo, extrarenalmente, en células β pancreáticas y del sistema inmunológico la expresión de CYP27B1 y VDR permite la producción y efecto locales de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Lagishetty et al., 2011; Maciel Griz et al., 2014).

El calcitriol regula directa o indirectamente no menos del 3% (\pm 900 genes) del genoma humano (**Tabla 2**) con acciones endocrinas, intracrinas, autocrinas y paracrinas (Baeke et al., 2008; Cavalier et al., 2011; Hernández Sánchez et al., 2011; Hewison, 2012).

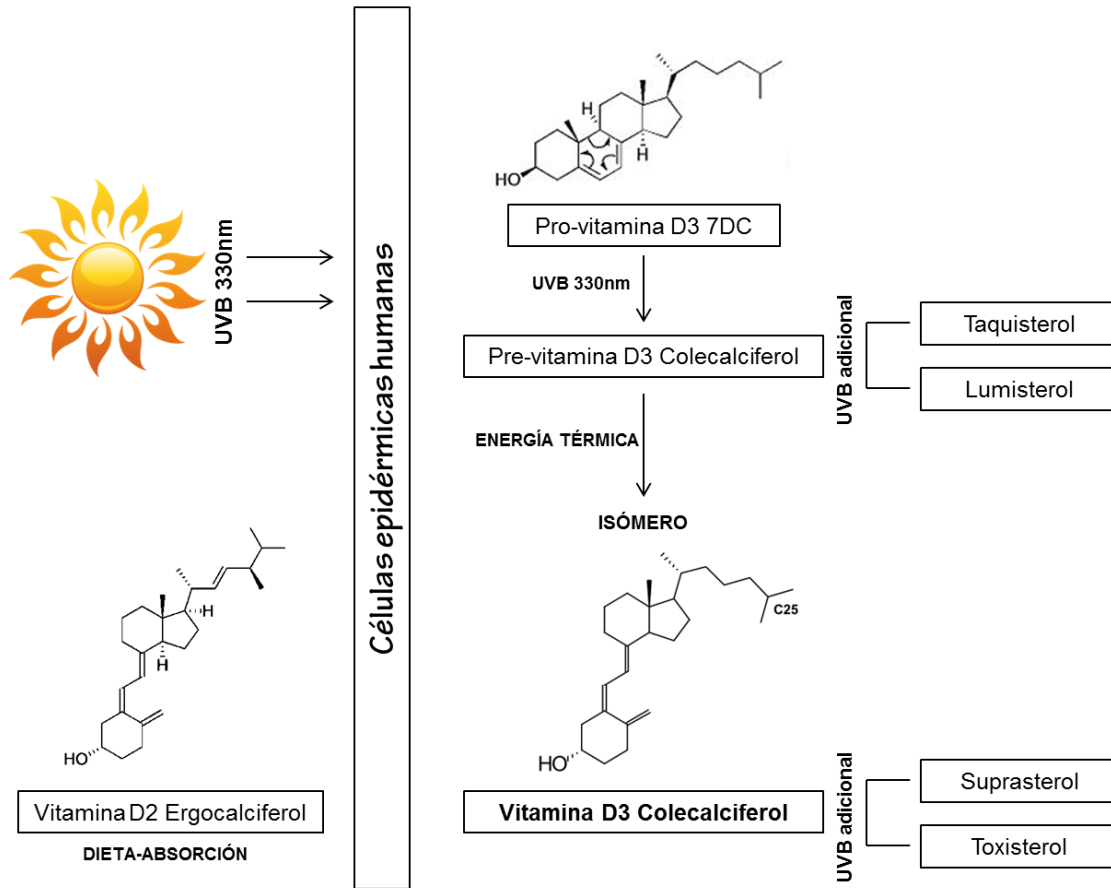


Figura 1. Síntesis epidérmica de colecalciferol en el humano. La radiación ultravioleta B (UVB 330 nm) solar es responsable de la conversión fotoquímica, en la epidermis, del 7-dehidro-colesterol (7DC) en pre-vitamina D3, que a su vez se isomeriza en el metabolito circulante colecalciferol por la energía térmica solar. La intoxicación por vitamina D, debida a la excesiva exposición a la luz solar, no es probable debido a que la UVB adicional transforma en los metabolitos biológicamente inactivos taquisterol y lumisterol a la pre-vitamina D3, y en suprasterol y toxisterol al isómero colecalciferol. El ergocalciferol es un metabolito proveniente del ergosterol de los vegetales y puede ser absorbido gastrointestinalmente proveniente de la dieta (Basado en Tourkey & Abdul Aziz, 2010; Wolpowitz & Gilchrest, 2006).

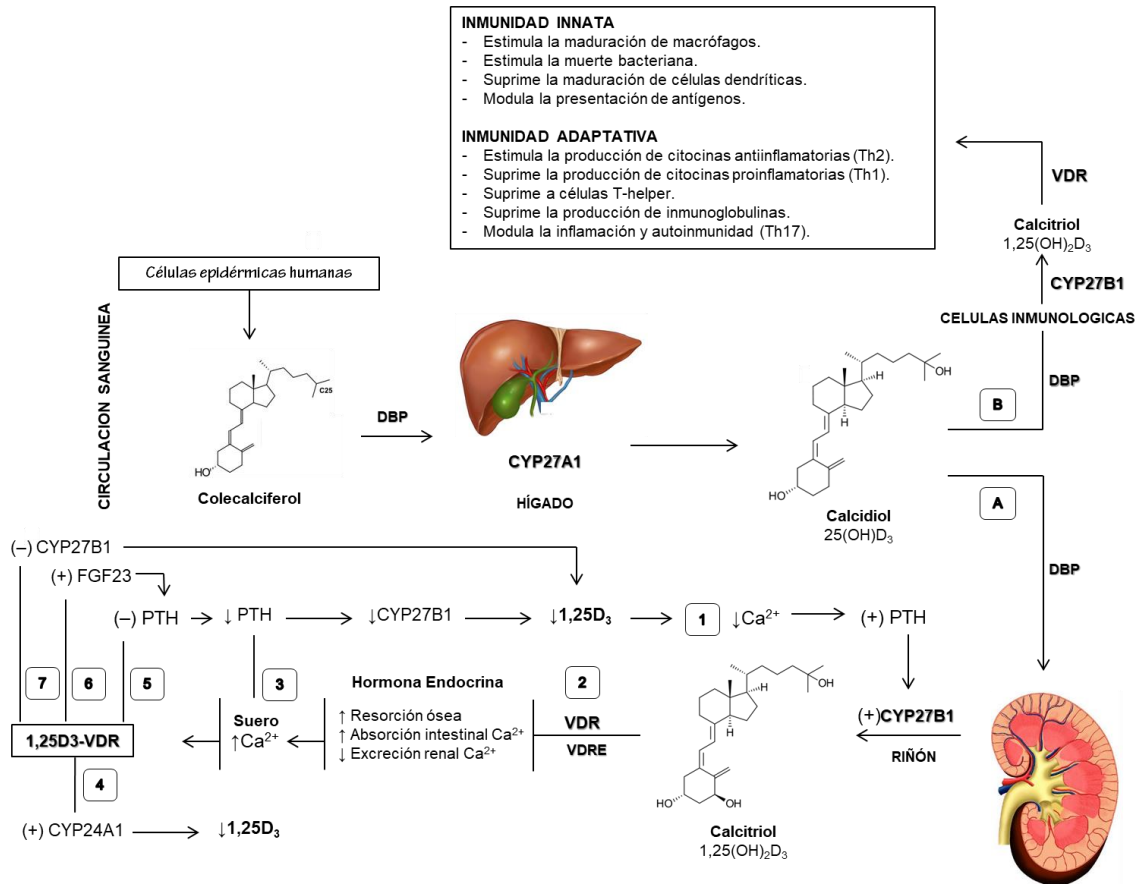


Figura 2. Síntesis y catabolismo de la hormona calcitriol, involucrada en el metabolismo del calcio en el humano. El colecalciferol, sintetizado en las células epidérmicas, y el ergocalciferol absorbido en la dieta viajan unidos a DBP, a través del torrente sanguíneo, hasta el hígado donde son convertidos en el precursor calcidiol (25(OH)D) por la enzima CYP27A1. (A) Posteriormente, 25(OH)D es liberado y transportado hasta el riñón para su activación. (1) La producción renal de calcitriol (1,25(OH)₂D) ocurre en respuesta a hipocalcemia sérica (Ca²⁺ < 2.25–2.5 nmol/L), lo cual estimula la liberación de la hormona paratiroidea (PTH) que induce la producción de CYP27B1 en los túbulos renales proximales. (2) El calcitriol es una hormona esteroidea que, con acciones endocrinas, regula y mantiene los niveles de Ca²⁺ en suero al inducir genes y la expresión de proteínas a través del VDR para promover la resorción ósea, incrementar la absorción intestinal y disminuir la excreción renal de Ca²⁺. (3) Cuando las células paratiroideas detectan altas concentraciones de Ca²⁺ la liberación de PTH es suprimida para atenuar la actividad del calcitriol. Además, de forma dosis dependiente, los niveles elevados de Ca²⁺ en suero conducen al decremento en las concentraciones de calcitriol, por diversos mecanismos que involucran a esta hormona, a través de (4) la inducción renal de CYP24A1, que inicia el catabolismo de 1,25(OH)₂D, o la atenuación de la actividad 1α hidroxilasa por (5) la represión directa de PTH, (6) la inducción en osteocitos del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) que reprime a PTH, y (7) la represión directa de CYP27B1 renal. (B) En un mecanismo independiente del Ca²⁺, el precursor de vitamina D también puede ser metabolizado en células inmunológicas para modular diversas respuestas (Basado en Bikle, 2014; Cavalier et al., 2011; Gombart, 2009; Hewison, 2010; Maciel Griz et al., 2014; Moreira & Hamadeh, 2010; White, 2012).

Tabla 2. Funciones globales de la vitamina D (1,25(OH)₂D).

Tejido o tipo celular	Gen o proteína	Efecto transcripcional	Mecanismo	Referencia
Metabolismo del calcio (Ca²⁺)				
Hueso.	BGP	Positivo	Metabolismo óseo.	Haussler et al., 2012
	SSP1	Positivo	Osteopontina: Metabolismo óseo.	Haussler et al., 2012
	LRP5	Positivo	Anabolismo óseo.	Haussler et al., 2012
Osteoclastos.	RANKL	Positivo	Resorción ósea.	Haussler et al., 2012
Osteoblastos.	BGLAP	Positivo	Osteocalcina: anabolismo óseo.	Moukayed & Grant, 2013
Glándula paratiroidea.	PTH	Negativo	Homeostasis mineral.	Haussler et al., 2012
Duodeno.	TRPV6	Positivo	Transporte intestinal Ca ²⁺ .	Haussler et al., 2012
Riñón Intestino delgado Duodeno	CALB1	Positivo	Calbidina D28k: homeostasis mineral (Ca ²⁺).	Moukayed & Grant, 2013
Riñón Intestino delgado Duodeno	S100G	Positivo	Calbidina D9k: homeostasis mineral (Ca ²⁺).	Moukayed & Grant, 2013
Riñón.	TRPV5	Positivo	Reabsorción Ca ²⁺ (túbulos distales).	Moukayed & Grant, 2013
Riñón.	NPT1; NPT2	Positivo	Reabsorción fosfato (túbulos proximales).	Moukayed & Grant, 2013
Riñón.	FGF23	Positivo	Reabsorción fosfato (túbulos proximales).	Haussler et al., 2012
Riñón.	klotho	Positivo	Reabsorción fosfato (túbulos proximales).	Haussler et al., 2012
Riñón.	CYP24A1	Positivo	Catabolismo de 1,25(OH) ₂ D.	Haussler et al., 2012
Sistema Nervioso Central				
Células gliales Hipocampo	NGF	Positivo	Diferenciación neuronal.	Moukayed & Grant, 2013
Células gliales Hipocampo	NTF3	Positivo	Diferenciación y mantenimiento neuronal.	Moukayed & Grant, 2013
Células gliales Hipocampo	LIF	Positivo	Neuroinmunomodulador.	Moukayed & Grant, 2013
Tejidos Endocrinos				
Glándula tiroidea.	TSH	Negativo	↓ Desordenes tiroideos.	Moukayed & Grant, 2013
Epitelio				
Queratinocitos.	SE	SE	↑ Diferenciación epidérmica.	Moukayed & Grant, 2013
Folículo capilar.	SE	SE	↑ Diferenciación.	Moukayed & Grant, 2013
Tracto reproductivo femenino.	SE	SE	Desarrollo del útero.	Moukayed & Grant, 2013
Tejido mamario.	SE	SE	↓ Crecimiento celular.	Moukayed & Grant, 2013
Próstata.	SE	SE	↓ Crecimiento celular.	Moukayed & Grant, 2013
Colon.	SE	SE	↓ Crecimiento celular.	Moukayed & Grant, 2013
Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)				
Macrófagos Células dendríticas	SE	SE	Inmunomodulador: Desregula presentación de antígenos.	Seshadri et al., 2011
Macrófagos Células dendríticas	SE	Negativo	Inmunomodulador: ↓ Citocinas proinflamatorias.	Seshadri et al., 2011
Linfocitos T reguladores.	IL4	Positivo	Inmunomodulador: ↑ Citocinas antiinflamatorias.	Seshadri et al., 2011
Células β pancreáticas.	IL1β; IFNγ	Negativo	Protección: ↓ Citocinas proinflamatorias.	Seshadri et al., 2011
Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)				
Células β pancreáticas.	CALB1	Positivo	Calbidina D28k: homeostasis mineral (Ca ²⁺). Secreción de insulina. ↓ Apoptosis.	Seshadri et al., 2011
Células β pancreáticas	Insulina	Positivo	Homeostasis glucosa.	Maciel Griz et al., 2014
Musculo esquelético (otros)	Receptor de insulina	Positivo	↓ Resistencia a insulina.	Moreira & Hamadeh, 2010
Células β pancreáticas.	SE	Negativo	↓ Resistencia a insulina. ↓ Citocinas proinflamatorias.	Seshadri et al., 2011

SE: Sin Especificar

1.7. Mecanismos bactericidas inducidos por la vitamina D en monocitos.

El estudio de la relación entre la fisiología de la vitamina D y el funcionamiento normal del sistema inmune se ha incrementado en la última década, analizando el vínculo que tiene la vitamina D con la actividad bactericida de los monocitos/macrófagos como células que forman parte del sistema inmune innato (Lagishetty et al., 2011).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa en contra de patógenos infecciosos, incluidos bacterias, virus, hongos y parásitos, que ocurre de manera inmediata y no específica. Los monocitos son fagocitos capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) por medio de receptores transmembranales de reconocimiento de patrones (PRR), entre ellos los receptores tipo Toll (TLR's) (Lagishetty et al., 2011).

Se han descrito al menos 11 subtipos de TLR's, compuestos de un dominio extracelular con afinidad a moléculas PAMP y un dominio intracelular (Güerri Fernández et al., 2009; White, 2012). La activación de estos receptores desencadena la inducción de diversas rutas de señalización intracelular conduciendo, entre otros procesos, a la expresión de péptidos antimicrobianos (fundamentalmente defensinas y catelicidinas en humanos) que destruyen al agente patógeno fagocitado (Güerri Fernández et al., 2009; Lagishetty et al., 2011).

En monocitos y macrófagos, el TLR9 reconoce DNA de *M. tuberculosis* (Basu et al., 2012), mientras el TLR2, implicado en el reconocimiento de LAM (Juárez et al., 2010), forma los complejos heterodiméricos TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6 que reconocen lipoproteínas triaciladas (19kDa) y diaciladas, respectivamente (Harding & Boom, 2010).

A través de un mecanismo dependiente del reconocimiento de *M. tuberculosis* vía TLR2/TLR1 que desencadena la inducción específica de la enzima 1 α -hidroxilasa-CYP27B1, los monocitos humanos tienen la capacidad de convertir al precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) a su forma activa 1,25(OH)₂D₃ 6-s-trans o calcitriol (**Figura 3**) (Hernández Sánchez et al., 2011; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011). Este proceso de activación está regulado por la enzima CYP24A1, inducida por el sustrato 1,25(OH)₂D₃ sintetizado localmente. Por tanto, la enzima CYP24A1 puede ser clave determinante en la respuesta de los monocitos al precursor de la vitamina D, convirtiendo a 1,25(OH)₂D₃ en el metabolito menos activo 1,24,25(OH)₃D₃ (**Figura 4**) (Baeke et al., 2008; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011; White, 2012; White, 2008).

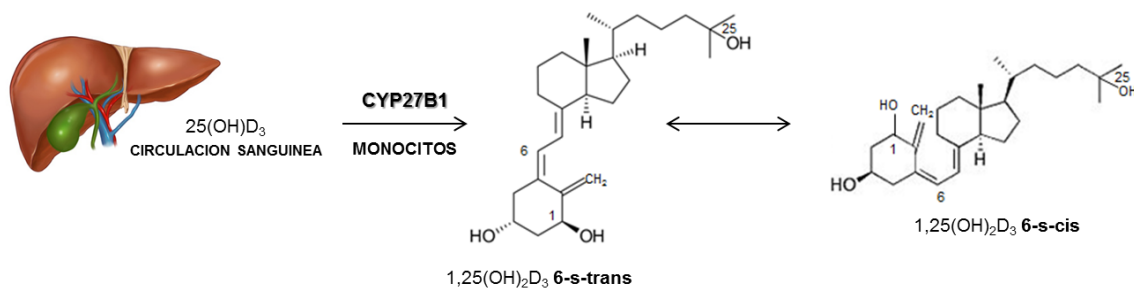


Figura 3. Isómeros del ligando activo 1,25(OH)₂D₃ de VDR. Del ligando activo 1,25(OH)₂D₃, existen dos isómeros que se forman espontáneamente, 6-s-*cis* y 6-s-*trans*; y ambos son ligandos de VDR. El receptor unido al ligando en *cis* promueve respuestas inmediatas, mientras que el ligando en *trans* se trasloca al núcleo y promueve las respuestas genómicas (Modificado de Hernández Sánchez et al., 2011).

En monocitos se expresa una forma truncada de CYP24A1 que carece del extremo amino-terminal de orientación mitocondrial (Ren et al., 2005; White, 2012). La variante empalmada de CYP24A1 (CYP24A-SV) mantiene su dominio de unión a esteroides al cual puede anclarse la 1,25(OH)₂D₃ o 25(OH)D₃, sin ser metabólicamente activa. Su abundante expresión en monocitos provee una explicación para los relativos bajos niveles de la actividad catabólica 24-hidroxilasa observada en estas células. Modelos moleculares sugieren que CYP24A-SV tiene mayor preferencia por 25(OH)D₃, limitando de sustrato a CYP27B1 (**Figura 4**) (Henry, 2011; Lagishetty et al., 2011). Debido a que la forma activa de la vitamina

D (1,25(OH)₂D₃) no reprime la expresión de CYP27B1, en monocitos humanos, la señalización de 1,25(OH)₂D₃ puede mantenerse por tiempos prolongados, lo cual es ventajoso en la respuesta a patógenos intracelulares de replicación lenta como *M. tuberculosis* (White, 2012).

El receptor de vitamina D (VDR; GB-ID: 7421; UniProt-ID: P11473; PDB-ID: 1DB1; **Anexo 10.1.**) es el factor de transcripción ligando inducido, dependiente del reconocimiento de *M. tuberculosis* en monocitos, que pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas y que media la acción del ligando hidrofóbico 1,25(OH)₂D₃ 6-s-trans (López López et al., 2014; Tourkey & Abdul Aziz, 2010).

Una vez unido a su ligando, el complejo 1,25(OH)₂D₃-VDR se heterodimeriza con los receptores retinoides X (RXR) y se trasloca al núcleo desde el citoplasma, a causa de la unión de proteínas motoras al dominio de activación de la transcripción AF-2 del VDR (Aranow, 2012; Güerri Fernández et al., 2009), asociándose en sitios específicos de reconocimiento del DNA denominados elementos de respuesta a vitamina D (VDRE's) (**Figura 4**), que son secuencias de hexanucleótidos ubicadas río arriba en el promotor de los genes blanco o en las regiones llamadas potenciadores (enhancers). Se ha reportado que la vitamina D (1,25(OH)₂D₃) regula 638 genes (induce 408; reprime 230) en monocitos humanos (Calberg et al., 2012; Hernández Sánchez et al., 2011).

La forma activa de la vitamina D (1,25(OH)₂D₃) controla la heterodimerización VDR-RXR y su unión a VDRE's, así como la función activadora o represora de los receptores en la transcripción genética (White, 2012).

El heterodímero 1,25(OH)₂D₃-VDR-RXR, estimulador de la inmunidad innata, opera en conjunto con varios coactivadores y corepresores conocidos como proteínas de interacción con el receptor de vitamina D (DRIP's) (Prosser & Jones, 2004), o proteínas coreguladoras que provocan la modificación de histonas, el

remodelamiento de la cromatina y la unión de la RNA polimerasa II, necesarias para la transcripción de genes como el del péptido antimicrobiano (AMP) LL-37 en monocitos humanos (White, 2012; White, 2008).

Los AMP's se clasifican en defensinas, catelicidinas e histatinas, en mamíferos. En tejidos que mantienen el primer contacto con los patógenos, los AMP's son liberados a partir de proteínas precursoras, que son modificadas en AMP's activos después de su secreción, para internalizarse en los fagosomas teniendo contacto fatal con los microorganismos fagocitados (Dürr et al., 2006; Xhindoli et al., 2016).

Se ha observado que, tras la infección con *M. tuberculosis*, los monocitos producen al péptido antimicrobiano LL-37 dependiente de vitamina D, implicado en la defensa contra la TB (Gombart, 2009; Güerri Fernández et al., 2009; Hernández Sánchez et al., 2011; Selvaraj, 2011) al intervenir en la señalización inmunológica (**Figura 5**) o formar poros que permeabilizan la membrana celular del patógeno, cuando su estructura helicoidal anfipática y catiónica (carga neta positiva) interactúa con los elementos estructurales bacterianos de carga negativa (Castañeda Casimiro et al., 2009; Xhindoli et al., 2016).

La síntesis de LL-37 en monocitos humanos está aumentada por la forma activa de la vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), cuando el heterodimero $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR puede interactuar con elementos del complejo de transcripción como el factor TFIIB para incrementar la tasa de síntesis del mRNA del gen hCAP18 que contiene VDRE (Dürr et al., 2006; Güerri Fernández et al., 2009; Hernández Sánchez et al., 2011; Selvaraj, 2011).

Este péptido antimicrobiano se secreta en sangre, encontrándose a 32.20 ± 10.4 y 44.53 ± 16.88 ng/mL en plasma de sujetos sanos y con TBP, respectivamente (Zhan & Jiang, 2015), y se sintetiza de forma local en tejidos expuestos a patógenos ambientales como la superficie del fluido bronquial (Güerri Fernández et al., 2009).

LL-37 (CAMP; GB-ID: 820; UniProt-ID: P49913; PDB-ID: 2K6O; **Anexo 10.1.**), la única catelicidina descrita en el humano, también es denominado hCAP18 debido a su cercana relación al péptido antimicrobiano de 18 kDa conocido como CAP18 en el conejo. El gen para hCAP18, también denominado CAMP o hCAP18/LL-37/FALL39 (Gombart, 2009; Hernández Sánchez et al., 2011), es un gen compuesto por cuatro exones. Los exones 1–3 codifican para la secuencia señal y el dominio *catelin*, mientras el exón 4 codifica para el AMP LL-37 (Dürr et al., 2006; Xhindoli et al., 2016).

El primer producto de la traducción, previo a la holoproteína, se denomina preproteína catelicidina, caracterizada por un dominio *catelin* (N-terminal) altamente conservado (100 aminoácidos). Este dominio está flanqueado por un péptido señal (30 aminoácidos) en su extremo amino terminal (N-terminal), que conduce a la preproteína a vesículas de almacenamiento (granulocitos) o al exterior celular, y por un péptido antimicrobiano en su extremo carboxilo terminal (C-terminal). La holoproteína catelicidina se denomina propéptido, puesto que no representa la forma activa y mantiene la forma de almacenamiento. Posteriormente, es modificada proteolíticamente por la proteasa de serina 3 para formar a LL-37 (16 kDa), un péptido antimicrobiano de 37 aminoácidos con actividad bactericida, siendo los dos residuos iniciales leucinas (**Figura 5**) (Dürr et al., 2006; Xhindoli et al., 2016).

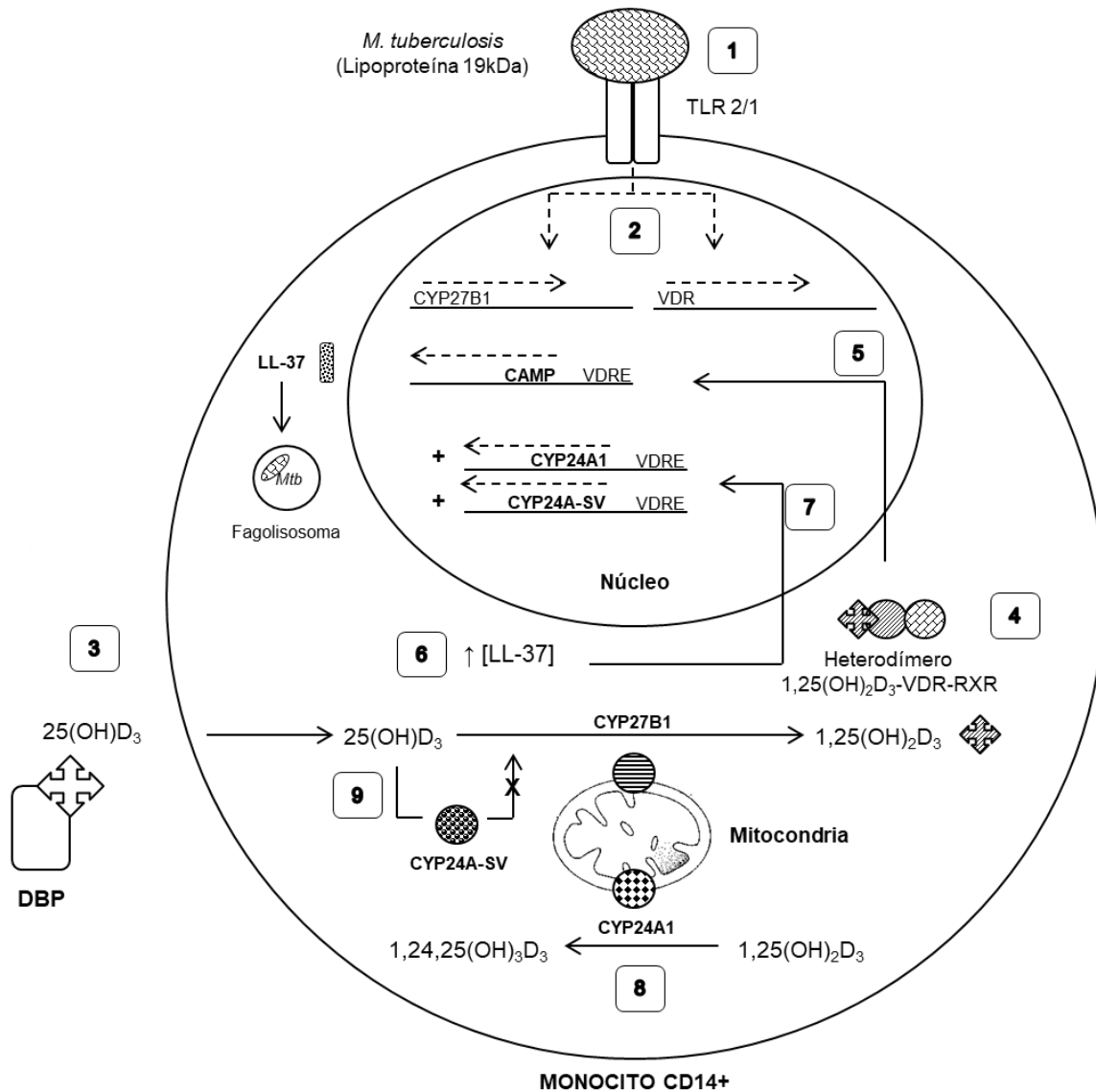


Figura 4. Mecanismo molecular intracelular dependiente de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para la producción de LL-37 en monocitos humanos durante la infección por *M. tuberculosis*. (1) El reconocimiento de la lipoproteína 19kDa de *M. tuberculosis* por el complejo TLR2/1 desencadena la (2) inducción y expresión de CYP27B1 y VDR. (3) El ingreso de $25(\text{OH})\text{D}_3$ transportada por DBP, desde el torrente sanguíneo, deriva en la producción local de calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) por CYP27B1 mitocondrial. (4) El calcitriol activa la heterodimerización de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR con RXR, para (5) traslocarse al núcleo e inducir la expresión del péptido antimicrobiano LL-37 (CAMP), que suprime potencialmente la proliferación del patógeno infeccioso, con acciones bactericidas dentro del fagolisosoma. (6) Mientras la concentración del péptido antimicrobiano va en aumento, de forma concentración-tiempo dependiente de LL-37, (7) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce a CYP24A1 y CYP24A-SV. (8) La expresión de CYP24A1 mitocondrial, en menor proporción, puede iniciar el catabolismo de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hacia $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$. (9) Sin embargo, se ha sugerido que la expresión abundante de CYP24A-SV citoplasmática, en monocitos, permite el secuestro del precursor $25(\text{OH})\text{D}_3$ para limitar de sustrato a CYP27B1 cuando las acciones de la vitamina D deben atenuarse (Basado en Baeke et al., 2008; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011; White, 2012; White, 2008).

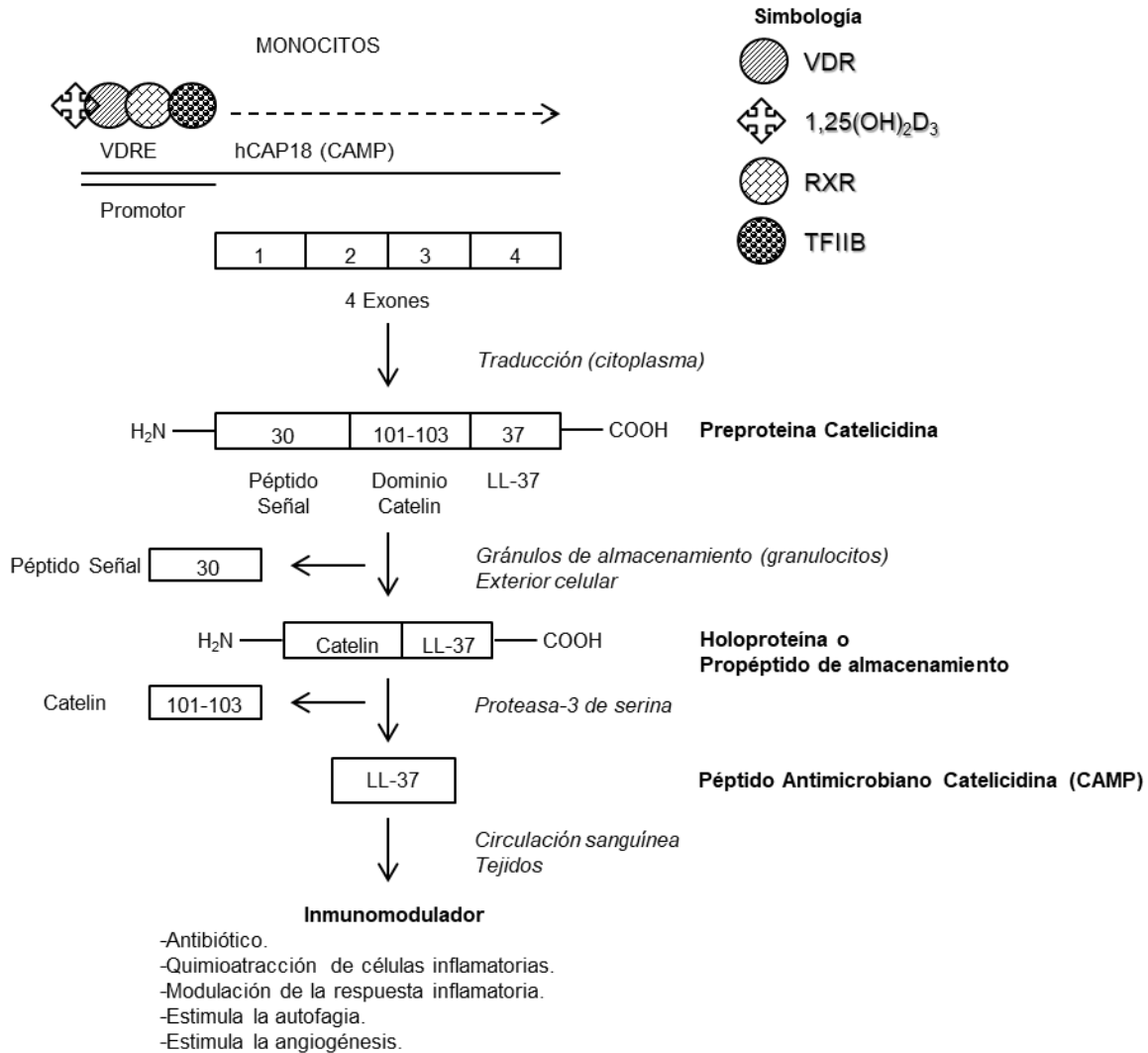


Figura 5. Procesamiento post-traduccion del péptido antimicrobiano LL-37. El LL-37 tiene una longitud de 37 residuos de aminoácidos, siendo dos leucinas (LL) los residuos iniciales. El heterodimero 1,25(OH)₂D₃-VDR-RXR debe interactuar con el factor TFIIB para incrementar la tasa de síntesis del mRNA del gen hCAP18 (CAMP) compuesto de 4 exones. El primer producto de la traducción se denomina preproteína catelicidina, conformada por un péptido señal de 30 residuos de aminoácidos, el dominio *catelin* de 101-103 aminoácidos y el CAMP. El péptido señal es escindido una vez que ha conducido a la preproteína a los gránulos de almacenamiento o al exterior celular. La formación de dos puentes disulfuro finaliza el procesamiento post-traduccion. La holoproteína o propéptido mantiene la forma de almacenamiento. Posteriormente, la proteasa-3 de serina escinde el dominio *catelin* liberando a LL37 en la circulación sanguínea por los monocitos o localmente por macrófagos y otras células. Además de unirse preferentemente a grupos de carga negativa, LL-37 modula la respuesta inflamatoria y la quimioatracción de células inmunes (Modificado de Dürr et al., 2006).

1.8. DM2 y el control de *M. tuberculosis* dependiente de la vitamina D.

Los mecanismos de la susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis* en pacientes con DM2 se han asociado a la deficiencia del precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) en sangre (Boillat Blanco et al., 2016). Estudios previos, a esta investigación, han sugerido que la acción de la vitamina D puede estar afectada en los pacientes con DM2, debido a que tienen bajos niveles del receptor VDR y de péptidos antimicrobianos como LL-37 (Liu et al., 2006; López López et al., 2014).

Adicionalmente, no existen datos sobre el metabolismo y el efecto del precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) en la inducción del péptido antimicrobiano LL-37 en pacientes con DM2, durante la infección con *M. tuberculosis* (Liu et al., 2006; López López et al., 2014; Restrepo & Schlesinger, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que los monocitos de sujetos sanos, después del reconocimiento de *M. tuberculosis* por los receptores tipo Toll (TLR's) membranales, son capaces de convertir al precursor de la vitamina D calcidiol (25(OH)D₃) a su forma activa calcitriol (1,25(OH)₂D₃) que participa en el control de la infección por *M. tuberculosis* mediante la inducción del péptido antimicrobiano LL-37.

El calcitriol (1,25(OH)₂D₃) se une al receptor VDR para formar un complejo y trasladarse al núcleo, donde funciona como factor de transcripción que se une al VDRE del gen del péptido antimicrobiano LL-37 e induce su expresión.

Se ha reportado que las células de sangre periférica de pacientes con DM2 tienen disminuida la expresión del VDR. Sin embargo, se desconoce el efecto de la hiperglucemia (altas concentraciones de glucosa en sangre) sobre el metabolismo de la vitamina D, la inducción del VDR y la inducción del péptido antimicrobiano LL-37 en monocitos humanos.

Por lo anterior, en esta tesis se evaluó el efecto de la hiperglucemia *in vitro* sobre la expresión del ARNm de los genes involucrados en el metabolismo de la vitamina D (CYP24A1 y CYP27B1), la inducción del receptor VDR y la inducción de LL-37 en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*.

3. HIPÓTESIS

Las altas concentraciones de glucosa disminuyen la expresión de LL-37 en monocitos de sujetos sanos a través de la inhibición de la enzima CYP27B1 durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Evaluar el efecto de las altas concentraciones de glucosa en la expresión del ARNm del péptido antimicrobiano LL-37 por la vía del metabolismo de la vitamina D en monocitos de sujetos sanos después de la infección con *M. tuberculosis*.

4.2. Objetivo Particular.

Evaluar el efecto de las altas concentraciones de glucosa (15 y 30 mM) en la expresión del ARNm de las enzimas CYP24A1 y CYP27B1, del receptor de vitamina D y del péptido antimicrobiano LL-37 en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* (MOI 1:1) y el precursor de la vitamina D (25(OH)D₃).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Reclutamiento de voluntarios y muestras sanguíneas.

En el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Ciudad de México, durante los meses de enero-abril del 2016, se invitó a participar en el presente estudio (B20-12) a seis sujetos de entre 20–60 años de edad y se les aplicó un cuestionario de datos clínicos y antecedentes patológicos. Después de verificar que fueran sujetos sanos, firmaron una carta de consentimiento informado para donar 80–120 mL de sangre periférica, la cual fue extraída por punción utilizando heparina (Inhepar[®] PiSA[®], Guadalajara México) como anticoagulante.

5.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica por gradiente de densidad.

En un tubo cónico de 50 mL, se diluyeron 20 mL de sangre con 20 mL de medio RPMI 1640 (Lonza BioWhittaker[™], Walkersville MD USA) suplementado con 2 mmol/L de L-Glutamina (Lonza BioWhittaker[®], Walkersville MD USA) y 50 µg/mL de Gentamicina (Lonza BioWhittaker[®], Walkersville MD USA). Se adicionaron 10 mL de solución separadora de linfocitos (Lonza BioWhittaker[™], Walkersville MD USA) y se centrifugó a 320 xg durante 45 minutos a 25°C.

Posteriormente, el anillo leucocitario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's), se transfirió por aspiración a un tubo nuevo y se sometió a tres lavados con 50 mL de medio RPMI 1640 G+G (Lonza BioWhittaker[™], Walkersville MD USA), cada uno de ellos a 320 xg durante 10 minutos a 4°C, rescatando el pellet celular. Los PBMC's obtenidos se contaron en una cámara de Neubauer, diluyendo 1:2 con 10 µL de azul de tripano para evaluar la viabilidad celular, la cual fue superior al 96% en todos los casos.

5.3. Purificación de monocitos por selección positiva.

Una vez concluido el tercer lavado y teniendo el pellet celular en total sequedad, se adicionaron 80 μL de Buffer Miltenyi (**Anexo 10.2.1.**) por cada 1×10^7 PBMC's totales, resuspendiendo por vortexeo. Posteriormente se adicionaron 10 μL de anticuerpo anti-CD14-Human Microbeads (MACS[®] Miltenyi Biotec, Germany) por cada 1×10^7 PBMC's totales, mezclando por agitación, para incubar durante 15 minutos a 4°C. Para eliminar el remanente de anticuerpo no adherido, se realizó un lavado con 2 mL de Buffer Miltenyi por cada 1×10^7 PBMC's totales, centrifugando a 510 xg durante 10 minutos a 4°C. El pellet celular obtenido se dejó en total sequedad y se resuspendió en 500 μL de Buffer Miltenyi por cada 1×10^8 PBMC's totales.

Se colocó un filtro (enfriado a 4°C) sobre una columna MS[®] (MACS[®] Miltenyi Biotec, Germany) adherida a un soporte magnético (MACS[®] Miltenyi Biotec, Germany). Para iniciar la purificación de los monocitos, a partir de la suspensión celular de PBMC's, se humedeció el filtro y la columna con 500 μL de Buffer Miltenyi. A continuación, se colocaron 500 μL de suspensión celular sobre el filtro dejando caer por gravedad hasta la última gota al interior de un tubo para la colecta de la fracción celular negativa (CD14⁻). Una vez colocada la suspensión celular en su totalidad y para asegurar que no quedaran remanentes, se adicionaron 2.5 mL de Buffer Miltenyi en el tubo de origen, volumen empleado para realizar cinco lavados, de 500 μL cada uno, sobre la columna. Posteriormente, la columna fue colocada sobre un tubo nuevo para adicionar 1 mL de Buffer Miltenyi y eluir a presión, con un émbolo y por duplicado, la fracción positiva de monocitos (CD14⁺) a 4°C.

Los monocitos CD14⁺ obtenidos fueron centrifugados a 510 xg durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante hasta total sequedad y se adicionó 1 mL de D-Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MD USA) 5.5 mM suplementada con 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado (HyClone[™], Logan Utah USA)

(Anexo 10.2.2). Los monocitos obtenidos se contabilizaron en una cámara de Neubauer, diluyendo 1:2 con 10 μ L de azul de tripano para evaluar la viabilidad celular, la cual fue superior al 96% en todos los casos.

5.4. Ensayo de hiperglucemia *in vitro*.

Se colocaron 1×10^6 monocitos / mL por pozo en placas de 24 pozos con las siguientes condiciones de D-Glucosa + 10% SFB por cuadruplicado: (A) concentración normoglucémica 5.5 mM (99 mg/dL), (B) condición de hiperglucemia 15 mM (270 mg/dL) y (C) condición de hiperglucemia 30 mM (540 mg/dL) (**Anexo 10.2.2.**). Los monocitos se incubaron durante 22 horas a 37°C y 5% de CO₂. Una vez concluido el tiempo de incubación, se estimuló por cada condición de glucosa (5.5, 15 y 30 mM) con: (Pozo 1) medio como control negativo (sin calcidiol y sin infección), (Pozo 2) 10 nM del precursor de vitamina D calcidiol 25(OH)D₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA), (Pozo 3) 10 nM del precursor de vitamina D calcidiol 25(OH)D₃ más *M. tuberculosis* H37Ra a una relación de infección de 1 (MOI 1:1), y (Pozo 4) con *M. tuberculosis* H37Ra a una relación de infección de 1 (MOI 1:1). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 22 horas (**Figura 6; Anexo 10.2.3.; Anexo 10.2.4.**).

Las condiciones experimentales se eligieron con base a estudios previos en donde se observó que los monocitos son viables hasta siete días en altas concentraciones de glucosa *in vitro* (15–50 mM) y que las concentraciones de glucosa representativas son 5.5 mM para normoglucemia, característica de sujetos sanos, mientras 15 y 30 mM son representativas de hiperglucemia, característica de pacientes con DM2 y de pacientes diabéticos con descontrol de los niveles de glucosa, respectivamente (González et al., 2012).

Por otro lado, durante la estandarización del proyecto, se realizó una cinética de tiempo y se observó la máxima expresión de los genes en monocitos a las 22 horas de incubación en el modelo de hiperglucemia *in vitro*. Así mismo, se realizó una curva de concentración de *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 1–10) y se eligió un MOI de 1 (una bacteria por monocito) para infectar a 1×10^6 monocitos, puesto que se observó la mejor inducción de los genes de CYP27B1 y VDR a esta concentración de micobacteria. Finalmente, la mejor inducción de LL-37, durante

la estandarización, se observó con 10 nmol/L del precursor de vitamina D (25(OH)D₃) durante la infección con *M. tuberculosis*, concentración elegida con base a una curva de concentración de calcidiol (1–500 nM).

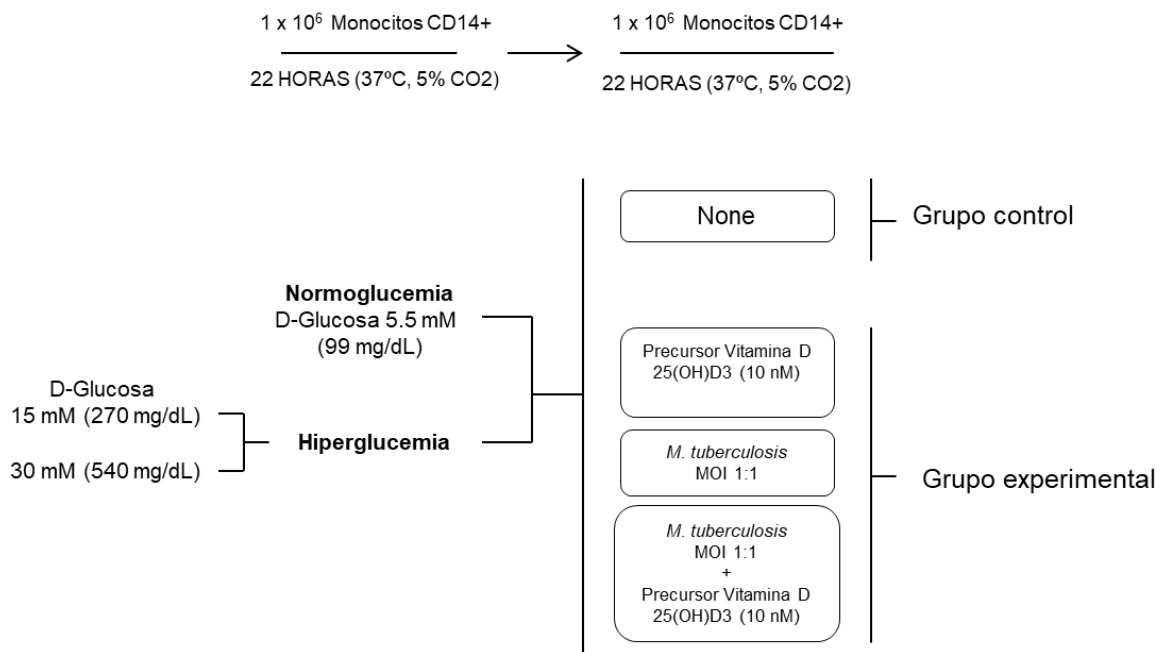


Figura 6. Diagrama de flujo para el desarrollo experimental del modelo de hiperglucemia *in vitro*.

5.5. Extracción de ARNm.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se colectaron los sobrenadantes en tubos eppendorf de 1.7 mL y a las células adheridas se les adicionaron 350 μ L de la solución de lisis RLT (QIAGEN, Hilden Germany). Los lisados celulares fueron colectados en tubos eppendorf de 1.7 mL y almacenados a -20°C . Posteriormente, se empleó el kit comercial RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany) para la extracción de ARN total, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cada lisado celular fue homogenizado por agitación, se le adicionaron 350 μ L de etanol (J. T. Baker[®], EUA) al 70% mezclando por inversión, se transfirió a una columna de separación y se centrifugó a 13523 xg durante 20 segundos a 25°C . El sobrenadante colectado en el tubo de procesamiento de la columna fue eliminado. Para lavar la columna, se le colocaron 350 μ L de solución RW1 y se centrifugó a 13523 xg durante 20 segundos a 25°C , eliminando el sobrenadante colectado.

Directamente sobre la membrana de la columna, se colocaron 80 μ L de DNasa I preparada (70 μ L Buffer RDD más 10 μ L DNasa I), del kit comercial RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Hilden Germany), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para degradar el ADN genómico, seguido de un lavado con 350 μ L de solución RW1 centrifugando a 13523 xg durante 20 segundos a 25°C y eliminando el sobrenadante colectado. Dos veces consecutivas se adicionaron 500 μ L de tampón RPE sobre la columna. Después de la primera adición se centrifugó a 13523 xg durante 20 segundos a 25°C , y a 13523 xg durante 2 minutos a 25°C después de la segunda adición. Finalmente, la columna se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.7 mL, se adicionaron 20 μ L de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana y se centrifugó a 6010 xg durante 1 minuto a 25°C , para eluir el ARN total. El procedimiento de elución fue repetido para incrementar la recuperación del material genómico y almacenarlo a -20°C .

5.6. Síntesis de ADNc por transcripción reversa.

El ARNm previamente purificado fue empleado para la síntesis del ADN complementario (ADNc). Para este procedimiento fue empleado el kit comercial SuperScript[®] First-Strand Synthesis System For RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad CA USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de 0.2 mL, por muestra, se adicionaron 2 μ L de Mezcla 1 (**Anexo 10.2.5.**) más 8 μ L de ARNm. Se incubó en el termociclador Veriti[®] 96-Well (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA) a 65°C durante 5 minutos y posteriormente a 4°C durante 2 minutos, para producir la desnaturalización del ARNm y permitir el alineamiento de los hexámeros (primers). A continuación, las muestras fueron incubadas a 25°C durante 10 minutos y se adicionaron 9 μ L de Mezcla 2 (**Anexo 10.2.5.**), así mismo 1 μ L (50 unidades) de la enzima transcriptasa reversa SuperScript II RT, mezclando y centrifugando correctamente, para producir la extensión de los hexámeros alineados. La síntesis del ADNc se llevó a cabo a 42°C durante 50 minutos, induciendo posteriormente la desactivación de la enzima retrotranscriptasa a 70°C durante 15 minutos. Al término de este ciclo, se adicionó 1 μ L de ribonucleasa RNase H a 4°C y se incubó a 37°C durante 20 minutos para remover el ARNm utilizado como template. Las muestras de ADNc sintetizado fueron almacenadas a -20°C.

5.7. Análisis de expresión de genes por PCR Tiempo Real y cuantificación relativa.

La amplificación de los genes por PCR tiempo real cuantitativa (qPCR) fue realizada empleando el ADNc sintetizado y las sondas TaqMan[®] Gene Expression Assay marcadas con el fluorocromo FAM[™] (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA).

Se preparó la mezcla de amplificación Duplex para qPCR colocando 3 μ L de agua DEPC (Invitrogen, Carlsbad CA USA), 10 μ L de TaqMan[®] Universal Master Mix II with UNG (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA) (**Anexo 10.2.6.**) y 1 μ L de sonda para el gen constitutivo 18S-rRNA-VIC[®] Control Mix (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA). De acuerdo al gen de interés, se adicionó 1 μ L de la sonda TaqMan[®] Gene Expression Assay, (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA) correspondiente (Hs00167999_m1**CYP24A1**, Hs00168017_m1**CYP27B1**, Hs01045840_m1**VDR** o Hs00189038_m1**CAMP**). Así mismo, se adicionaron 5 μ L del ADNc diluido 1:5.

En el termociclador StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA) se incubaron las muestras a 50°C durante 2 minutos, requeridos para la actividad óptima de la enzima UNG. Posteriormente, se promovió la activación de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos, cada uno a 95°C durante 15 segundos para inducir la desnaturalización de estructuras secundarias de ADNc sintetizado, y 60°C durante 1 minuto para iniciar la polimerización de nuevas cadenas de ADN y la hidrólisis de las sondas TaqMan[®] alineadas (95–60°C).

Los cambios en la expresión del ARNm de los genes fueron analizados por el método del ciclo de umbral comparativo ($\Delta\Delta$ CT), después de calcular la expresión relativa con el software StepOne[™] v2.2.2 (Applied Biosystems[®], Foster City CA USA). Durante la PCR en tiempo real, la fluorescencia emitida por las sondas

TaqMan[®] degradadas fue detectada en un ciclo (CT) determinado. Para calcular los incrementos o decrementos con base en la cantidad de material genético en cada muestra, se normalizó la expresión del ARNm de los genes evaluados, con el ARNm del gen endógeno humano 18S-rRNA, restando el valor CT del 18S-rRNA al valor CT del gen de interés, para obtener un Δ CT o valor de expresión real. Posteriormente, empleando los valores de expresión real, se comparó ($\Delta\Delta$ CT) la expresión del ARNm del gen de interés en el modelo de hiperglucemia, respecto al grupo control (calibrador) de glucosa 5.5 mM sin calcidiol y sin infección. Finalmente, se reportaron los incrementos o decrementos en la expresión de ARNm, normalizando a uno uniformemente al calibrador ($2^{-\Delta\Delta$ CT).

5.8. Análisis estadísticos.

Para evaluar el efecto de la hiperglucemia (glucosa 15 y 30 mM) respecto a las condiciones normales de glucosa (5.5 mM), se aplicó la prueba de Friedman, y posteriormente la prueba de Dunn, sobre los valores de expresión relativa del ARNm de cada uno de los genes amplificados por qPCR en seis individuos, considerando el valor de las medianas de los tratamientos, a través del Software GraphPad-Prism[®] para Windows versión 7.02.

Para describir las variables cuantitativas se utilizó la mediana como medida de tendencia central, debido a la distribución no normal que mostraron los valores de expresión del ARNm de los genes de interés entre los tratamientos, al ser evaluados con las pruebas de Shapiro-Wilk y D'Angostino-Pearson. Así mismo, se empleó la prueba de Friedman no paramétrica para comparar tres o más grupos relacionados o pareados, es decir grupos evaluados en varios tratamientos, permitiendo el control de la variabilidad experimental entre las muestras de los sujetos, que puede aumentar o disminuir las mediciones entre los individuos.

Los datos fueron ordenados en filas (sujetos) y columnas (tratamientos de glucosa) por el Software GraphPad-Prism[®] 7.02, para aplicar la prueba de Friedman considerando un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Así, cuando los valores de P eran menores al nivel de significancia ($p < 0.05$), se rechazó la hipótesis de que las diferencias entre los tratamientos de glucosa se debían a eventos aleatorios (muestreo), y se concluyó que al menos uno de los tratamientos alteró la inducción del gen evaluado respecto a la condición control de normoglucemia, habiendo diferencias significativas entre las medianas respectivas, con un nivel de confianza del 95%. Si el valor de P era mayor al nivel de significancia, no había razón suficiente para concluir que las medianas generales diferían.

La prueba de Dunn se empleó debido a que el estudio requería múltiples comparaciones, esto es, evaluar el efecto de la hiperglucemia respecto al grupo control de normoglucemia. Si las diferencias se debían por lo menos a uno de los tratamientos (Friedman $p < 0.05$), la prueba de Dunn permitió evaluar cuál o cuáles de los tratamientos de glucosa tuvieron algún efecto sobre la expresión del ARNm de los genes de interés, respecto al grupo control de normoglucemia, en monocitos humanos.

Para evaluar las diferencias entre los tratamientos de hiperglucemia (glucosa 15 o 30 mM) respecto al tratamiento control normoglucémico (glucosa 5.5 mM), por condición (estimulación con vitamina D y/o la infección con *M. tuberculosis*), se aplicó la prueba de Dunn considerando un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Si los valores de P eran menores ($p < 0.05$), se han reportado diferencias significativas entre los tratamientos y las medianas correspondientes, con un nivel de confianza del 95%.

6. RESULTADOS

6.1. Muestras biológicas.

Las características clínicas de los sujetos sanos se muestran en la **Tabla 3**, los cuales no refirieron diagnóstico de DM o infecciones al momento de la toma de muestra sanguínea. La relación F:M fue 5:1 con una edad media de 38 años.

Tabla 3. Características clínicas y antecedentes patológicos de los sujetos sanos (n = 6).

Dato clínico o antecedente	Resultado (\bar{x})	Valores de referencia
Demografía		-
Sexo (Femenino : Masculino)	5 : 1	-
Edad (años)	37.8 (22 – 59)	-
Residencia	Ciudad de México	-
Fumadores	No	-
Antropometría		Ensenarro et al., 2012.
Estatura (cm)	157.5 (150 – 178)	157
Peso (Kg)	58.7 (50 – 76)	46 – 61
Índice de Masa Corporal	23.5 (21.4 – 24.8)	19 – 25
Signos vitales		Aguayo P. & Lagos T., s.f.
Presión arterial (mmHg)	112 / 72	100 – 120 / 60 – 80
Frecuencia cardiaca (latidos / min.)	72.8 (62 – 93)	60 – 80
Temperatura (°C)	36.7 (36.3 – 37.5)	36 – 37
Antecedentes patológicos		-
Antecedentes personales DM	Ninguno	-
Antecedentes personales TB	Ninguno	-

6.2. La hiperglucemia *in vitro* no altera la inducción de CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos humanos.

Los monocitos-macrófagos son esenciales para el control de *M. tuberculosis* a través de la inducción de péptidos antimicrobianos dependientes de la forma activa de la vitamina D (Gombart, 2009; Selvaraj, 2011), y se ha demostrado que células de sangre periférica de pacientes con DM2 tienen disminuida la expresión del VDR (López López et al., 2014).

Al evaluar si la hiperglucemia *in vitro* alteraba la inducción génica, los resultados mostraron que las altas concentraciones de glucosa 15 y 30 mM no afectan la expresión del ARNm de CYP24A1 (datos no mostrados), CYP27B1 (**Figura 7A**), VDR (**Figura 7B**) y LL-37 (**Figura 7C**), respecto a la condición de glucosa 5.5 mM.

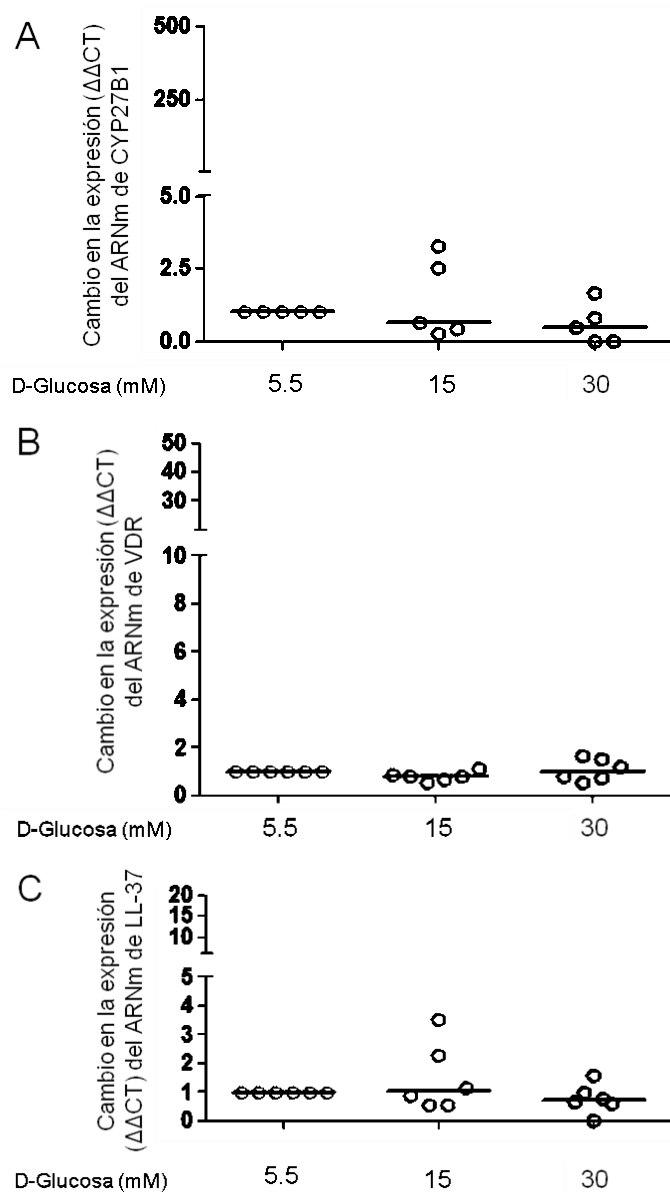


Figura 7. Efecto de la hiperglucemia *in vitro* en la expresión del ARNm de CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos humanos. 1×10^6 monocitos humanos fueron incubados con 5.5, 15 y 30 mM de glucosa. La expresión del ARNm de la (A) 1α -hidroxilasa CYP27B1, del (B) receptor de la vitamina D (VDR) y del (C) péptido antimicrobiano LL-37 fue evaluada a las 44 horas de incubación con D-glucosa. Los cambios (eje y) fueron normalizados con el ADNc del gen constitutivo 18S-rRNA y representados con relación a la expresión génica de monocitos incubados en 5.5 mM de glucosa, normalizada a 1 utilizando el método $\Delta\Delta\text{CT}$ por qPCR. Los datos son representados como la mediana para CYP27B1 (n = 5), VDR (n = 6) y LL-37 (n = 6), analizados por la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman y posteriormente por la prueba de Dunn. Para ambas pruebas se consideró un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Friedman: (A) $p = 0.3673$; (B) $p = 0.1840$; (C) $p = 0.5705$. Dunn: $p > 0.05$.

6.3. El precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) no altera la inducción de CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos humanos incubados en hiperglucemia *in vitro*.

Se ha reportado que el precursor de la vitamina D, 25(OH)D₃ o calcidiol, no ejerce efectos sobre la inducción de la enzima CYP27B1 o del factor transcripcional VDR, estando ausentes su conversión a la forma hormonal activa calcitriol y la inducción del péptido antimicrobiano LL-37 cuando no existen condiciones de infección en monocitos de sujetos sanos (Liu P. et al., 2006; Liu P. et al., 2007).

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar si el precursor de la vitamina D calcidiol (25(OH)D₃) tenía efecto sobre la expresión del ARNm de CYP27B1 (**Figura 8A**), VDR (**Figura 8B**) o LL-37 (**Figura 8C**), en 5.5 mM de glucosa, o en hiperglucemia *in vitro* 15 y 30 mM, respecto a los monocitos incubados en sólo glucosa 5.5 mM.

El precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) no tuvo efectos sobre la inducción de CYP24A1 (datos no mostrados).

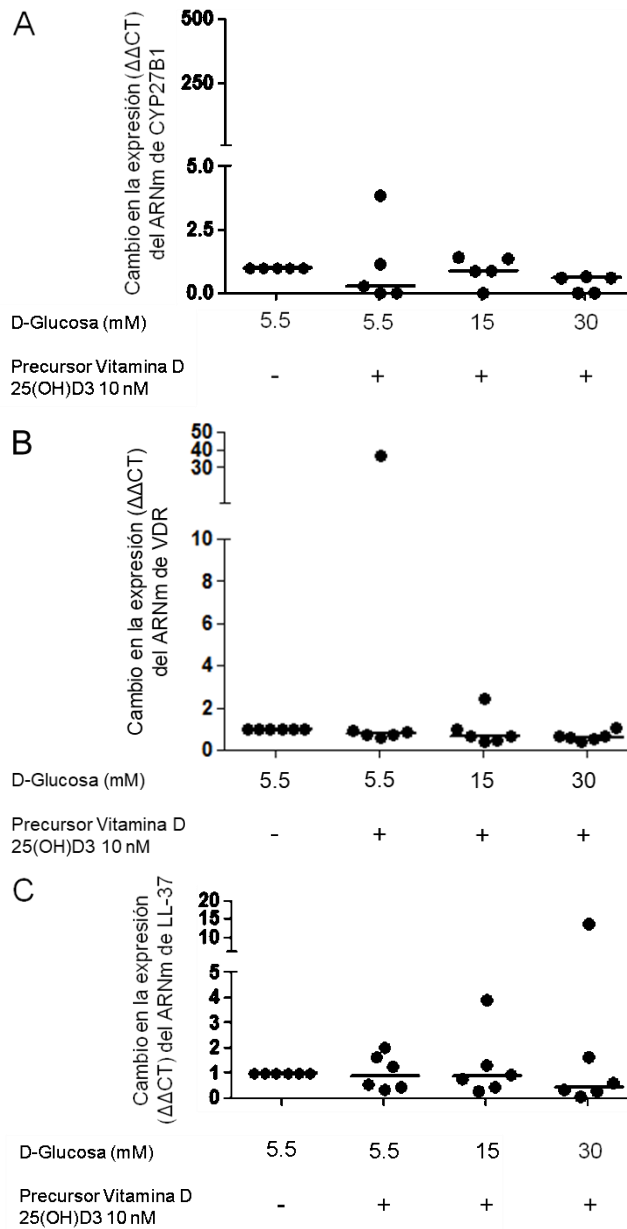


Figura 8. Efecto del precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) en la expresión del ARNm de CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos humanos incubados en hiperglucemia *in vitro*. 1×10^6 monocitos humanos fueron incubados con 5.5, 15 y 30 mM de glucosa, durante 22 horas. Posteriormente, fueron estimulados con el precursor 25(OH)D₃ 10 nM. La expresión del ARNm de la (A) 1α -hidroxilasa CYP27B1, del (B) receptor de la vitamina D (VDR) y del (C) péptido antimicrobiano LL-37 fue evaluada 22 horas después de la estimulación. Los cambios (eje y) fueron normalizados con el ADNc del gen constitutivo 18S-rRNA y representados con relación a la expresión génica de monocitos incubados en 5.5 mM de glucosa, normalizada a 1 utilizando el método $\Delta\Delta$ CT por qPCR. Los datos son representados como la mediana para CYP27B1 (n = 5), VDR (n = 6) y LL-37 (n = 6), analizados por la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman y posteriormente por la prueba de Dunn. Para ambas pruebas se consideró un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Friedman: (A) $p = 0.1882$; (B) $p = 0.1555$; (C) $p = 0.6787$. Dunn: $p > 0.05$.

6.4. La infección con *M. tuberculosis* no induce a CYP27B1 en monocitos humanos incubados en 30 mM de glucosa *in vitro*.

Por otra parte, se ha demostrado que el reconocimiento de patógenos bacterianos como *M. tuberculosis* induce la expresión de la enzima CYP27B1 y del VDR en monocitos de sujetos sanos (Hernández Sánchez et al., 2011; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011).

Al evaluar si las altas concentraciones de glucosa modifican el efecto de *M. tuberculosis* sobre la inducción de estos genes, en monocitos de sujetos sanos se observó que *M. tuberculosis* incrementó la expresión del ARNm de CYP27B1 en glucosa 5.5 y 15 mM ($p < 0.05$) pero no en glucosa 30 mM (**Figura 9A**). La infección con *M. tuberculosis* no tuvo efectos sobre la inducción de CYP24A1 (datos no mostrados).

Respecto a VDR, se observó que *M. tuberculosis* incrementó la expresión del ARNm en glucosa 5.5, 15 y 30 mM (**Figura 9B**; $p < 0.05$).

Por último, se ha reportado que la inducción de LL-37 durante la infección con *M. tuberculosis* requiere la presencia del precursor de la vitamina D (Liu P. et al., 2006; Liu P. et al., 2007). Al evaluar el efecto de *M. tuberculosis* en ausencia del precursor de la vitamina D se observó que la infección disminuyó la expresión del ARNm de LL-37 ($p = 0.0076$), respecto a los monocitos no infectados en glucosa 5.5 mM. El mismo efecto se observó en monocitos expuestos a glucosa 15 mM ($p = 0.0076$), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en glucosa 30 mM (**Figura 9C**).

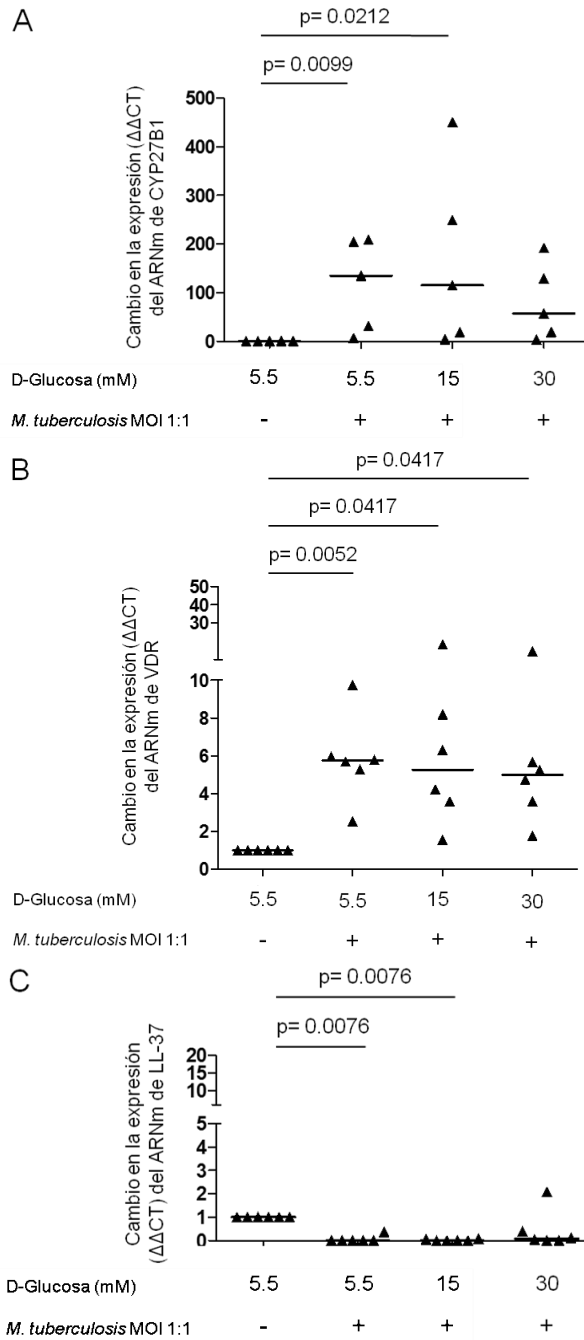


Figura 9. Efecto de la infección con *M. tuberculosis* en la expresión del ARNm de CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos humanos incubados en hiperglucemia *in vitro*. 1×10^6 monocitos humanos fueron incubados con 5.5, 15 y 30 mM de glucosa, durante 22 horas. Posteriormente, fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Ra MOI 1:1. La expresión del ARNm de la (A) 1α -hidroxilasa CYP27B1, del (B) receptor de la vitamina D (VDR) y del (C) péptido antimicrobiano LL-37 fue evaluada 22 horas después de la infección. Los cambios (eje y) fueron normalizados con el ADNc del gen constitutivo 18S-rRNA y representados con relación a la expresión génica de monocitos incubados en 5.5 mM de glucosa, normalizada a 1 utilizando el método $\Delta\Delta CT$ por qPCR. Los datos son representados como la mediana para CYP27B1 (n = 5), VDR (n = 6) y LL-37 (n = 5), analizados por la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman y posteriormente por la prueba de Dunn. Para ambas pruebas se consideró un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Friedman: (A) $p = 0.0055$; (B) $p = 0.0040$; (C) $p = 0.0001$. Dunn: $p < 0.05$.

6.5. La infección con *M. tuberculosis* no induce a CYP27B1 y VDR en monocitos humanos incubados en 30 mM de glucosa *in vitro*.

Para que los monocitos expresen al péptido antimicrobiano LL-37 se necesita la conversión del precursor de la vitamina D calcidiol (25(OH)D₃) a su forma activa calcitriol (1,25(OH)₂D₃), a través de la enzima CYP27B1 inducida por patógenos como *M. tuberculosis* (Liu P. et al., 2006; Liu P. et al., 2007).

Debido a que en pacientes con DM2 la actividad bactericida se encuentra disminuida (Restrepo & Schlesinger, 2013), es posible que la hiperglucemia afecte la conversión del precursor calcidiol a la forma activa de la vitamina D calcitriol o la inducción de LL-37 dependiente de calcitriol a través del VDR inducido por *M. tuberculosis*. Por lo cual, se evaluó si la hiperglucemia *in vitro* afecta la expresión del ARNm de la enzima CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos infectados con *M. tuberculosis* y estimulados con el precursor de vitamina D (25(OH)D₃).

Se observó que en monocitos estimulados con el precursor de la vitamina D e infectados con *M. tuberculosis* (MOI 1:1) incrementó la expresión del ARNm de CYP27B1 (**Figura 10A**; $p = 0.0212$) y VDR (**Figura 10B**; $p = 0.0052$) pero no de LL-37 en glucosa 5.5 mM.

Al evaluar el efecto de las condiciones de hiperglucemia *in vitro* 15 mM, se observó sólo el incremento en la expresión del ARNm de la enzima CYP27B1 (**Figura 10A**; $p = 0.0429$) y de VDR (**Figura 10B**; $p = 0.0219$).

Al evaluar el efecto de las condiciones de hiperglucemia *in vitro* 30 mM, la expresión del ARNm de CYP27B1, VDR y LL37 no incrementó (**Figura 10A-C**).

Respecto a la enzima CYP24A1, no se observó la expresión del ARNm en alguna condición (datos no mostrados).

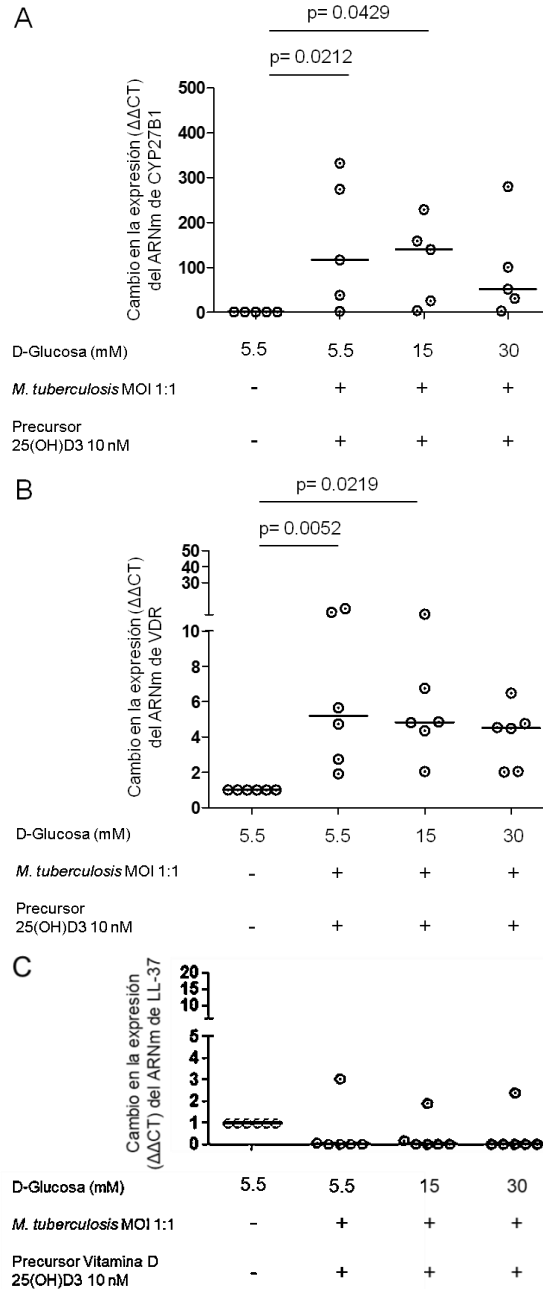


Figura 10. Efecto del precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) y de *M. tuberculosis* en la expresión del ARNm de CYP27B1, VDR y LL-37 en monocitos humanos incubados en hiperglucemia *in vitro*. 1×10^6 monocitos humanos fueron incubados con 5.5, 15 y 30 mM de glucosa, durante 22 horas. Posteriormente, fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Ra MOI 1:1 y estimulados con 25(OH)D3 10 nM. La expresión del ARNm de la (A) 1 α -hidroxilasa CYP27B1, del (B) receptor de la vitamina D (VDR) y del (C) péptido antimicrobiano LL-37 fue evaluada 22 horas después de la infección. Los cambios (eje y) fueron normalizados con el ADNc del gen constitutivo 18S-rRNA y representados con relación a la expresión de monocitos incubados en 5.5 mM de glucosa, normalizada a 1 utilizando el método $\Delta\Delta\text{CT}$ por qPCR. Los datos son representados como la mediana para CYP27B1 (n = 5), VDR (n = 6) y LL-37 (n = 6), analizados por la prueba de ANOVA no paramétrica de Friedman y posteriormente por la prueba de Dunn. Para ambas pruebas se consideró un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Friedman: (A) $p = 0.0167$; (B) $p = 0.0033$; (C) $p = 0.0745$. Dunn: (A-B) $p < 0.05$; (C) $p > 0.05$.

7. DISCUSION

Con una historia de casi 30 años, la suplementación con vitamina D se ha establecido como una opción en complemento al tratamiento farmacológico en pacientes con TB (Gombart, 2009; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011; White, 2008). Debido a que las concentraciones de vitamina D correlacionan inversamente con el padecimiento a TB y DM2, se sugiere que la vitamina D puede ser un mediador entre estas enfermedades (Boillat Blanco et al., 2016).

Los monocitos son células de sangre periférica que tienen la capacidad de metabolizar la vitamina D y de inducir la expresión de péptidos antimicrobianos (Güerri Fernández et al., 2009; Hernández Sánchez et al., 2011; Hewison, 2012; Lagishetty et al., 2011). Se ha reportado que los mecanismos antimicrobianos de la vitamina D se encuentran disminuidos en pacientes con DM2 incrementando la susceptibilidad a desarrollar TB (Restrepo & Schlesinger, 2013), en donde el principal factor de riesgo de susceptibilidad es la hiperglucemia (Geerlings & Hoepelman, 1999). Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares por los cuales los pacientes con DM2 son susceptibles a la infección con *M. tuberculosis*.

Se ha reportado que la expresión de la enzima CYP27B1, necesaria para la conversión del precursor de la vitamina D (25(OH)D₃) a su forma activa 1,25(OH)₂D₃, no se encuentra afectada en pacientes con DM2 (López López et al., 2014). En la presente investigación, se evaluó el efecto de dos concentraciones altas de glucosa (15 y 30 mM) sobre la expresión del ARNm de la enzima CYP27B1 en monocitos de sujetos sanos (**Tabla 3**) y se observó que la hiperglucemia no altera la expresión del ARNm de CYP27B1 (**Figura 7A**).

Por otro lado, también se ha reportado que la expresión del receptor VDR, necesario para la traslocación de la vitamina D al núcleo, parece ser afectada por las altas concentraciones de glucosa (25 mM) en células THP1 (Jain et al., 2015). Estos resultados difieren con la respuesta observada en monocitos de sangre

periférica de sujetos sanos, donde las altas concentraciones de glucosa (15 y 30 mM) no afectaron la expresión del ARNm de VDR (**Figura 7B**).

Aunque se ha reportado que la inducción del péptido antimicrobiano LL-37 se encuentra disminuida en células de sangre periférica de pacientes con DM2 (López López et al., 2014), al evaluar el efecto de la hiperglucemia *in vitro* en monocitos de sujetos sanos no se observó alguna alteración (**Figura 7C**). Esta discrepancia puede deberse al tipo de células evaluadas.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que las condiciones de hiperglucemia no alteran la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D (CYP24A1 y CYP27B1), la inducción del VDR y de LL-37.

Está bien documentado que *M. tuberculosis* induce la expresión del ARNm de CYP27B1 y VDR en monocitos de sujetos sanos (Liu P. et al., 2006; Liu P. et al., 2007) y que la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis* en pacientes con DM2, padecimiento asociado con hiperglucemia, se encuentra disminuida (Restrepo & Schlesinger, 2013). En el modelo de hiperglucemia analizado, observamos que *M. tuberculosis* incrementó la expresión del ARNm de CYP27B1 (**Figura 9A**) y de VDR (**Figura 9B**) en condiciones normales de glucosa 5.5 mM y en hiperglucemia 15 mM. Sin embargo, *M. tuberculosis* no indujo la expresión del ARNm de CYP27B1 en condiciones de glucosa alta 30 mM. Este mecanismo podría estar asociado con la susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*, favorecido por los cambios en las concentraciones de glucosa.

Respecto a la expresión de LL-37, se sabe que antígenos de *M. tuberculosis* en ausencia del precursor de la vitamina D no alteran la expresión del péptido antimicrobiano LL-37 en monocitos de sujetos sanos (Liu et al., 2006). En este estudio se observó que en condiciones normoglucémicas y de hiperglucemia 15 mM la infección con *M. tuberculosis* H37Ra disminuyó la expresión del ARNm de LL-37 (**Figura 9C**). Estas diferencias pueden deberse a que en investigaciones previas, como la de Liu P. y colaboradores (2006), se emplean antígenos

purificados de *M. tuberculosis* mientras nosotros infectamos con la bacteria completa, lo cual sugiere un posible mecanismo de evasión por el patógeno a la inducción de LL-37.

En monocitos infectados con *M. tuberculosis* y estimulados con el precursor de la vitamina D (25(OH)D₃), el ARNm de CYP27B1 y de VDR incrementaron por acción de la micobacteria en glucosa 5.5 y 15 mM (**Figura 10A-B**), lo que sugiere la conversión del precursor a la forma activa de la vitamina D y la inducción de LL-37 por 1,25(OH)₂D₃.

El dato más relevante, se observó cuando se estimula con el precursor de la vitamina D y se infecta con *M. tuberculosis* en glucosa 30 mM. A esta concentración de glucosa no se indujo el ARNm de CYP27B1 y de VDR, lo que sugiere una deficiencia en la conversión del precursor de la vitamina D a su forma activa (1,25(OH)₂D₃) aunado a una deficiente inducción de LL-37 cuando se tienen valores de glucosa iguales a 540 mg/dL.

El incremento en la inducción de LL-37 no se observó en ninguna de las condiciones evaluadas (**Figura 10C**). Más estudios se requieren, para evaluar si una concentración mayor a los valores fisiológicos recomendados del precursor de la vitamina D puede contrarrestar el efecto inhibitorio de *M. tuberculosis* en la inducción de LL-37, y para evaluar si la hiperglucemia afecta la producción proteica y/o la actividad de la enzima CYP27B1 y del receptor VDR.

8. CONCLUSIÓN

En condiciones de hiperglucemia 30 mM, la infección con *M. tuberculosis* no induce la expresión del ARNm de CYP27B1 y VDR en monocitos humanos. Ésto sugiere una deficiencia tanto en la conversión del precursor de la vitamina D a su forma activa (1,25(OH)₂D₃), como en la inducción de LL-37 dependiente de 1,25(OH)₂D₃, en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, lo cual incrementa la susceptibilidad al desarrollo de TBP en pacientes con DM2 con un control deficiente de la hiperglucemia.

9. REFERENCIAS

1. Adams JS, Chen H, Chun R, et al. **Substrate and enzyme trafficking as a means of regulating 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis and action: the human innate immune response.** *J Bone Miner Res.* 2007;22 (Suppl 2):20-24.
2. Aguayo P. A, Lagos T. AP. **Guía clínica de control de signos vitales.** Universidad Pedro de Valdivia. Facultad de Ciencias de la Salud. s.f.
3. Aranow C. **Vitamin D and the Immune System.** *J Investig Med.* 2012;59(6):881-886.
4. Baeke F, Etten E van, Gysemans C, Overbergh L, Mathieu C. **Vitamin D signaling in immune-mediated disorders: Evolving insights and therapeutic opportunities.** *Mol Aspects Med.* 2008;29(6):376-387.
5. Basu J, Shin DM, Jo EK. **Mycobacterial signaling through toll-like receptors.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2(145):1-6.
6. Bikle DD. **Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications.** *Chem Biol.* 2014;21(3):319-329.
7. Blanco Quirós A, Arranz Sanz E, Garrote Adrados JA. **Luz solar, vitamina D y tuberculosis.** *Bol Pediatr.* 2009;49(209):220-226.
8. Boillat Blanco N, Bovet P, Ramaiya KL, et al. **Association between tuberculosis, diabetes and 25 hydroxyvitamin D in Tanzania: a longitudinal case control study.** *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):1-9.
9. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. **Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases.** *Nutrition.* 2011;27(4):399-404.

10. Brennan PJ. **Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis***. *Tuberculosis*. 2003;83(1-3):91-97.
11. Castañeda Casimiro J, Ortega Roque JA, Venegas Medina AM, et al. **Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones**. *Alergia, asma e Inmunol*. 2009;18:16-29.
12. Calberg C, Seuter S, Heikkinen S. **The First Genome-wide View of Vitamin D Receptor Locations and Their Mechanistic Implications**. *Anticancer Res*. 2012;32(1):271-282.
13. Cavalier E, Delanaye P, Souberbielle JC, Radermecker RP. **Vitamin D and type 2 diabetes mellitus: where do we stand?** *Diabetes Metab*. 2011;37(4):265-272.
14. Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. **High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes**. *Diabetes*. 2008;57(11):3090-3098.
15. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. **LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides**. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2006;1758(9):1408-1425.
16. Dusso AS, Gomez Alonso C, Cannata Andia JB. **The hypercalcaemia of CYP24A1 inactivation : new ways to improve diagnosis and treatment**. *Clin Kidney J*. 2015;8(4):456-458.
17. Ensenarro LA, Contreras Rojas M, Canto y Dorado J Del, Vílchez Dávila W. **Guía técnica para la valoración nutricional antropométrica de la persona adulta**. Lima: Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. 2012.

18. Geerlings SE, Hoepelman AI. **Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM).** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26(3-4): 259-265.
19. Gombart AF. **The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection.** *Future Microbiol.* 2009;4(9):1151-1165.
20. González Y, Herrera MT, Soldevilla G, et al. **High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes.** *BMC Immunol.* 2012;13(19):1-14.
21. González Hernández Y, Sada Díaz E, Escobar Gutiérrez A, Muños Torrico M, Torres Rojas M. **Asociación de tuberculosis y diabetes mellitus: Mecanismos inmunológicos involucrados en la susceptibilidad.** *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2009;22(1):48-55.
22. Gorocica P, Jiménez Martínez MDC, Garfias Y, Sada I, Lascarain R. **Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis.** *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2005;18(2):142-153.
23. Güerri Fernández RC, Díez Pérez A, Mellibovsky Saidler L, Quesada Gómez JM. **La vitamina D como elemento inmunitario en las infecciones.** *Med Clin (Barc).* 2015;133(9):344-348.
24. Harding CV, Boom WH. **Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors.** *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):296-307.
25. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. **Molecular mechanisms of vitamin D action.** *Calcif Tissue Int.* 2013;92(2):77-98.

26. Henry HL. **Regulation of vitamin D metabolism.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):531-541.
27. Hernández Sánchez F, Herrera Barrios MT, Torres Rojas 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):252-260.
28. Hewison M. **Vitamin D and immune function: autocrine, paracrine or endocrine?** *Scand J Clin Lab Invest.* 2012;72(Suppl 243):92-102.
29. Hewison M. **Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme.** *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(2):365-379.
30. Inda Filho AJ, Melamed ML. **Vitamin D and Kidney Disease. What we know and what we.** *J Bras Nefrol.* 2013;35(4):323-331.
31. Jain SK, Kahlon G, Bass P, Levine SN, Warden C. **Can L-Cysteine and Vitamin D Rescue Vitamin D and Vitamin D Binding Protein Levels in Blood Plasma of African American Type 2 Diabetic Patients?** *Antioxid Redox Signal.* 2015;23(8):688-693.
32. Juárez E, Sarabia C, Escobedo D, Sada E, Torres M. **Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por TLR2 y TLR9 en macrófagos alveolares y monocitos humanos.** *Neumol Cir Torax.* 2010;69(2):84-90.
33. Khoo AL, Chai LYA, Koenen HJPM, et al. **Vitamin D3 down-regulates proinflammatory cytokine response to *Mycobacterium tuberculosis* through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production.** *Cytokine.* 2011;55(2):294-300.

34. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Helmunt R. **1,25-Dihydroxyvitamina D₃ Production and Vitamin D₃ Receptor Expression Are Developmentally Regulated During Differentiation of Human Monocytes Into Macrophages.** *Blood*. 1993;82(4):1300-1307.
35. Lagishetty V, Liu NQ, Hewison M. **Vitamin D metabolism and innate immunity.** *Mol Cell Endocrinol*. 2011;347(1-2):97-105.
36. Larcombe L, Orr P, Turner Brannen E, Slivinski CR, Nickerson PW, Mookherjee N. **Effect of vitamin D supplementation on *Mycobacterium tuberculosis*-induced innate immune responses in a Canadian Dené First Nations cohort.** *PLoS One*. 2012;7(7):1-7.
37. Levin A, Li YC. **Vitamin D and its analogues: Do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease?** *Kidney Int*. 2005;68:1973-1981.
38. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. **Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response.** *Science*. 2006;311(5768):1770-1773.
39. Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. **Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin.** *J Immunol*. 2007;179(4):2060-2063.
40. López DE, Melgarejo Hernández MA, Aguilar Salinas CA. **La diabetes tipo 2 y la tuberculosis en México: la confluencia de dos retos para el sistema de salud.** *Acta Med*. 2012;10(4):189-195.

41. López López N, González Curiel I, Castañeda-Delgado J, et al. **Vitamin D supplementation promotes macrophages' anti-mycobacterial activity in type 2 diabetes mellitus patients with low vitamin D receptor expression.** *Microbes Infect.* 2014;16(9):755-761.
42. López Sigüero JP, Pino A DEL. **Diabetes mellitus tipo 1.** *An Pediatr Contin.* 2003;1(1):15-20.
43. Maciel Griz LH, Bandeira F, Andrade Lima Gabbay M, Atala Dib S, Carvalho EF DE. **Vitamin D and diabetes mellitus: an update - 2013.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(1):1-8.
44. Moreira TS, Hamadeh MJ. **The role of vitamin D deficiency in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.** *E Spen Eur E J Clin Nutr Metab.* 2010;5(4):155-165.
45. Moukayed M, Grant WB. **Molecular Link between Vitamin D and Cancer Prevention.** *Nutrients.* 2013;5(10):3993-4021.
46. Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, Urashima M. **Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease.** *World J Diabetes.* 2016;7(5):89-100.
47. Nandy D, Janardhanan R, Mukhopadhyay D, Basu A. **Effect of hyperglycemia on human monocyte activation.** *J Investig Med.* 2011;59(4):661-667.
48. Ocampo Cifuentes M. **Caracterización de la unión específica a macrófagos de péptidos derivados de lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* y análisis de la respuesta inmune.** Universidad Nacional de Colombia. 2014:119.

49. Organización Mundial de la Salud. **Informe mundial sobre la diabetes.** Disponible en: <http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>. Publicado abril 2016. Accesado julio 2017.
50. Organización Mundial de la Salud. **Tuberculosis (TB).** Disponible en: <http://www.who.int/tb/data/en/>. Publicado 2016. Accesado julio 2017.
51. Pittas AG, Dawson-Hughes B. **Vitamin D and diabetes.** *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;43(1):205-232.
52. Prosser DE, Jones G. **Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D.** *Trends Biochem Sci.* 2004;29(12):664-673.
53. Raja A. **Immunology of tuberculosis.** *Indian J Med Res.* 2004;120(4):213-232.
54. Ren S, Nguyen L, Wu S, Encinas C, Adams JS, Hewison M. **Alternative splicing of vitamin D-24-hydroxylase: a novel mechanism for the regulation of extrarenal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis.** *J Biol Chem.* 2005;280(21):20604-20611.
55. Restrepo BI, Schlesinger LS. **Host-pathogen interactions in tuberculosis patients with type 2 diabetes mellitus.** *Tuberculosis (Edinb).* 2013;93(Suppl 0):1-9.
56. Rivas Santiago B, Hernández Pando R, Carranza C, 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):935-941.

57. Rochel N, Molnár F. **Structural aspects of Vitamin D endocrinology.** *Mol Cell Endocrinol.* 2017;17(30):30159-30164.
58. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. **Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns.** *Eur J Immunol.* 2006;36(2):361-370.
59. Schuster DP, Duvuuri V. **Diabetes mellitus.** *Clin Podiatr Med Surg.* 2002;19(1):79-107.
60. Selvaraj P. **Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Cathelicidin in the Treatment of Tuberculosis.** *Vitam Horm.* 2011;86:307-325.
61. Seshadri KG, Tamilselvan B, Rajendran A. **Role of Vitamin D in Diabetes.** *J Endocrinol Metab.* 2011;1(2):47-56.
62. Siswanto S, Zuhriyah L, Handono K, Fitri LE, Prawiro SR. ***Mycobacterium tuberculosis* DNA Increases Vitamin D Receptor mRNA Expression and the Production of Nitric Oxide and Cathelicidin in Human Monocytes.** *Malaysian J Med Sci.* 2015;22(3):18-24.
63. Skelly AH. **Type 2 Diabetes Mellitus.** *Nurs Clin North Am.* 2006;41(4):531-547.
64. Tung YC, Ou TT, Tsai WC. **Elevated 1- α Hydroxylase Activity in Monocytes from Patients with Active Tuberculosis.** *Clinical and Developmental Immunology.* 2013;2013:1-5.
65. Tuorkey MJ, Abdul Aziz KK. **Strategies for diabetes and pathways of vitamin D.** *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2010;4(2):101-110.

66. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, et al. **Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression.** *J Immunol.* 2004;173:2909-2912.
67. White JH. **Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection.** *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):58-63.
68. White JH. **Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity.** *Infect Immun.* 2008;76(9):3837-3843.
69. Williams S, Malatesta K, Norris K. **Vitamin D and Chronic Kidney Disease.** *Ethn Dis.* 2009;19(4 Suppl 5):S5 8-11.
70. Wolden Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. **Vitamin D and diabetes: Its importance for beta cell and immune function.** *Mol Cell Endocrinol.* 2011;347(1-2):106-120.
71. Wolpowitz D, Gilchrist BA. **The vitamin D questions: How much do you need and how should you get it?** *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2):301-317.
72. Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A. **The human Cathelicidin LL-37 – A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator.** *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(3):546-566.
73. Xiao X, Wang Y, Hou Y, Han F, Ren J, Hu Z. **Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy.** *J Int Med Res.* 2016;44(3):673-684.

74. Zhan Y, Jiang L. **Status of vitamin D, antimicrobial peptide cathelicidin and T helper-associated cytokines in patients with diabetes mellitus and pulmonary tuberculosis.** *Exp Ther Med.* 2015;9(1):11-16.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO Antecedentes.

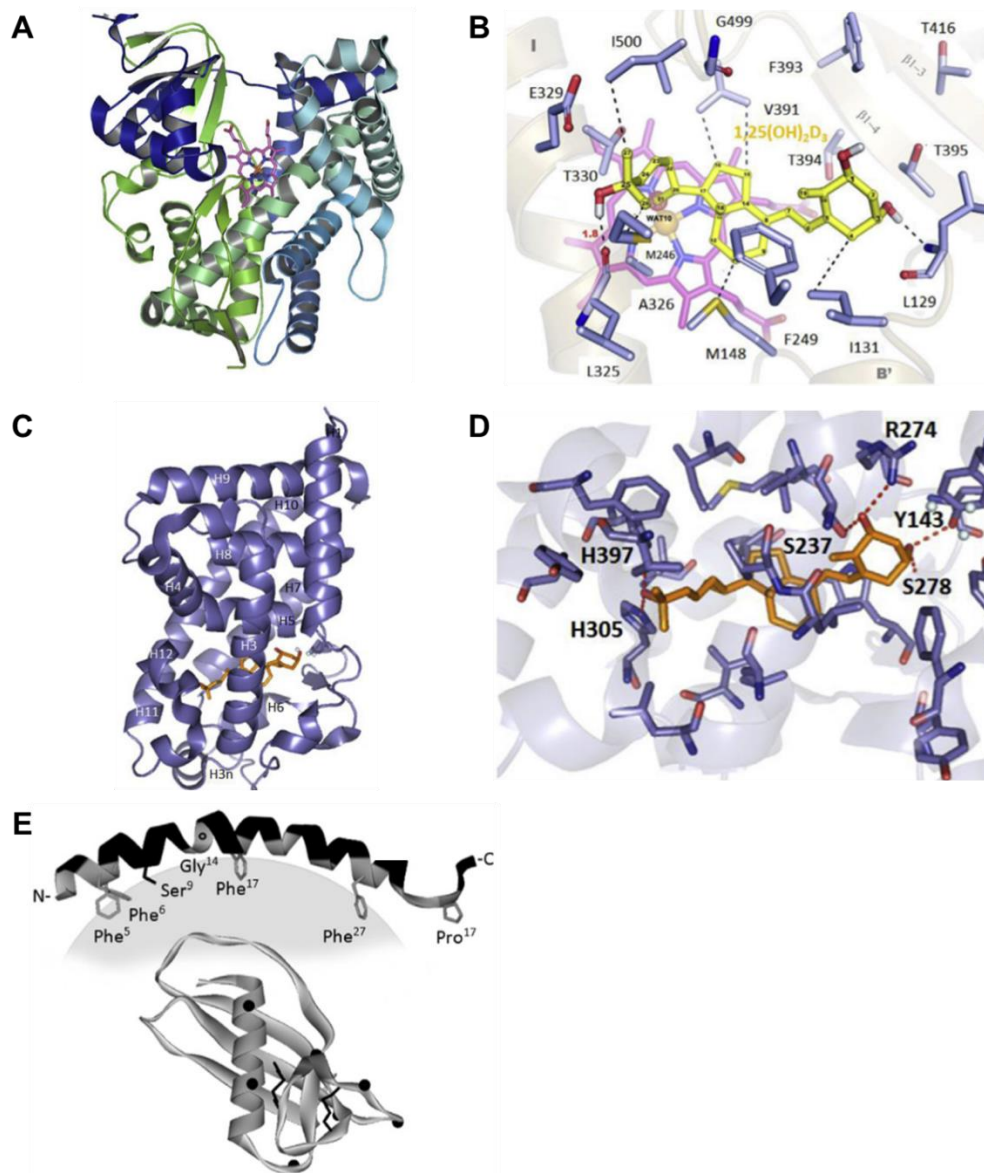


Figura 11. Estructura cristalina de las proteínas del catabolismo y mecanismos antimicrobianos de la vitamina D. A. Estructura general de **CYP24A1** (Cromosoma 20, 482 residuos aminoácidos) (PDB-ID: 3K9V). En rosa el grupo heme del sitio activo de unión a secosteroides. B. En amarillo, el calcitriol (1,25(OH)₂D₃) unido al grupo heme central (rosa) e interactuando con los aminoácidos (morado) que flanquean al sitio activo de CYP24A1. C. Estructura general del dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de vitamina D (**VDR**; Cromosoma 12, 259 residuos aminoácidos) (PDB-ID: 1DB1). El LBD unido a calcitriol (1,25(OH)₂D₃) está conformado por 13 α-hélices (morado). D. Los tres grupos hidroxilo (OH) de 1,25(OH)₂D₃ (naranja) anclados a LBD por enlaces de hidrogeno específicos representados con líneas discontinuas. E. Estructura general de **LL-37** (Cromosoma 3, 37 residuos aminoácidos) (PDB-ID: 2K6O) en presencia de micelas de SDS o DOPG (arriba; gris tenue). Abajo, vista de los puentes disulfuro (palillos; negro). Las esferas negras indican la posición de los residuos aniónicos (Tomado de Xindoli et al., 2016; Rochel & Molinar; 2017).

10.2. ANEXO Material y métodos.

10.2.1. Preparación de Buffer Miltenyi para la selección positiva de monocitos CD14⁺.

En 400mL de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (Lonza BioWhittaker™, Walkersville MD USA) 0.01 M, pH 7.2, se adicionaron 2.5 g (0.5%) de albumina sérica bovina fracción V (BSA) (Calbiochem, San Diego CA) y 2 mL (2 mM) de EDTA (Invitrogen, USA Grand Island NY) 0.5 M, pH 8, hasta disolver. Posteriormente se aforó a 500 mL y esterilizó por filtración con membrana de 0.22 mm. El buffer preparado fue almacenado a 4°C.

10.2.2. Preparación de soluciones de D-Glucosa.

Se prepararon 50 mL de tres soluciones, a diferente concentración, de D Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA) (PM= 180.2 g/mol), con medio RPMI 1640 1X sin glucosa (Gibco™, USA), suplementado con L-Glutamina.

A. Solución D-Glucosa 5.5 mM.

Se preparó una solución 10X (55 mM), colocando 0.49 g de D-Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA) en 50 mL de medio RPMI 1640 (Gibco™, USA). Para incubar los monocitos, en D-Glucosa 5.5 mM, se realizó una dilución 1:10, del stock 10X de D-Glucosa, en medio RPMI 1640 (Gibco™, USA).

B. Solución D-Glucosa 15 mM

Se preparó una solución 1X, disolviendo 0.14 g de D-Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA) en 50 mL de medio RPMI 1640 (Gibco™, USA).

C. Solución D-Glucosa 30 mM.

Se preparó una solución 1X, disolviendo 0.27 g de D-Glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA) en 50 mL de medio RPMI 1640 (Gibco™, USA).

D. Suplementación con Suero Fetal Bovino (SFB).

Para incubar los monocitos aislados, por condición, se suplementó a cada solución de D-Glucosa con el 10% de SFB. Para 1 mL requerido por pozo, se diluyeron 100 µL de SFB (HyClone™, Logan Utah USA) en 900 µL de solución de D-Glucosa.

10.2.3. Reconstitución y preparación de soluciones de vitamina D.

Para reconstituir 1 mg de 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA), de PM = 400.64 g/mol, y llevarlo a una concentración final 1 mM, se adicionaron al vial 2.5 mL de etanol (J. T. Baker[®], EUA).

Se preparó una solución 10 nM de calcitriol 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA) y de calcidiol 25(OH)D₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO USA), a partir de una solución 1 mM.

Para la estimulación con vitamina D *in vitro*, del stock 1 mM se realizó una dilución 1:100 con 99 μ L de D-Glucosa 5.5 mM + 10% SFB para llevarlo a una concentración 10 μ M. Por último, de la dilución 10 μ M, se realizó una dilución 1:1000, para llevarlo a una concentración final 10 nM. La dilución 1:1000 se realizó directamente en el pozo, conteniendo 999 μ L de suspensión celular en D-Glucosa 5.5, 15 o 30 mM + 10% SFB.

10.2.4. Disgregación de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Un vial stock de *M. tuberculosis* H37Ra (2×10^8 /mL) descongelado, después de estar almacenado a -70°C, se centrifugó a 6010 xg durante 8 minutos, para eliminar el medio de cultivo y adicionar 1 mL de D-Glucosa 5.5 mM + 10% SFB. Se agitó en vórtex durante cinco minutos, para hacer pasar a la suspensión celular diez veces por una jeringa de 3 mL y posteriormente por una jeringa de 1 mL, hasta que no hubiese estancamiento y fluyera libremente por el cuerpo de la jeringa. Se centrifugó a 60 xg durante 2 minutos, para obtener en un pellet los grumos celulares que no lograron disgregarse, y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo de 1 mL, obteniendo una suspensión a una concentración final de 2×10^8 micobacterias por mililitro de D-Glucosa 5.5 mM. Para infectar a 1×10^6 monocitos/mL, con un MOI 1:1, se colocaron 5 μ L de suspensión micobacteriana.

10.2.5. Mezclas para la síntesis de ADNc por transcripción reversa.

Para la preparación de las mezclas necesarias para la síntesis de ADNc por transcripción reversa, se emplearon los reactivos incluidos en el kit comercial SuperScript® First-Strand Synthesis System For RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad CA USA). Los reactivos se adicionaron en el volumen indicado, por muestra.

Tabla 4. Preparación de Mezcla 1: para el alineamiento de hexámeros (RNA/primer).

Reactivo	Concentración	Volumen (µL) / muestra
Random hexamers	50 ng/µl	1
Mezcla de dNTP	10 mM	1
Agua DEPC	Volumen Final	10

Tabla 5. Preparación de Mezcla 2: para la transcripción reversa (RT).

Reactivo	Concentración	Volumen (µL) / muestra
Buffer RT	10 X	2
MgCl ₂	25 mM	4
DTT	0.1 M	2
RNase OUT RRI*	40 U/ µl	1

*Recombinant Ribonuclease Inhibitor.

10.2.6. Composición del reactivo TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems®, Foster City CA USA).

Concentración 2X

AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP (Ultra Pure).

Uracil-N glicosilasa (UNG).

dNTPs con dUTP.

Marcador de referencia pasiva ROX™.

Componentes optimizados de buffer.