



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE SALUD

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"**

ESPECIALIDAD EN:
NEUMOLOGÍA

**EFFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
CITOCINAS EN CÉLULAS THP-1 INFECTADAS DE AISLADOS
CLÍNICOS DE MICOBACTERIAS**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MEDICO ESPECIALISTA EN:
NEUMOLOGÍA

PRESENTA
DR. GERARDO RODRÍGUEZ MENDOZA

TUTOR Y ASESOR:
DRA. MARTHA TORRES ROJAS

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2018





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.

**EFFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA PRODUCCIÓN
DE CITOCINAS EN CÉLULAS THP-1 INFECTADAS DE
AISLADOS CLÍNICOS DE MICOBACTERIAS**

**SECRETARIA DE SALUD
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"
NEUMOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**

**DRA. MARGARITA FERNÁNDEZ VEGA
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA**

**DRA. MARIA DEL CARMEN CANO SALAS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO**

**DRA. MARTHA TORRES ROJAS
ASESOR Y TUTOR DE TESIS DE TITULACIÓN EN NEUMOLOGÍA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, Alfredo Rodriguez Ortiz y Ma. Margarita Mendoza Alba, quienes con su ejemplo me han impulsado a luchar por mis metas, quienes me han enseñado el valor del esfuerzo y perseverancia. Y que no importa que tan difícil o imposible parezcan las cosas, se pueden lograr.

Gracias por su apoyo incondicional, por estar siempre presentes en las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, por sus palabras de aliento en momentos difíciles, por su cariño y afecto, por impulsarme a ser mejor cada día. Y sobre todo por ser mis padres.

“Este logro es suyo”

¡Gracias!

“Un momento de dolor vale la pena por una vida de gloria”

Unbroken

ÍNDICE

1. Introducción	6
2. Planteamiento del problema	18
3. Justificación	21
4. Pregunta de Investigación	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	23
7. Material y métodos	
a. Lugar de estudio	24
b. Descripción de la población de estudio	24
c. Procedimientos del estudio	24
8. Implicaciones éticas	25
9. Resultados	26
10. Discusión	38
11. Conclusiones	43
12. Anexos	45
13. Referencias Bibliográficas	46
14. Abreviaturas	49

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la expresión “micobacterias no tuberculosas” (MNT) es la más comúnmente utilizada para referirse a las especies del género *Mycobacterium* distintos de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y *Mycobacterium leprae*, que pueden ser patógenos para el ser humano produciendo las enfermedades conocidas como “micobacteriosis”. También se conocen como “micobacterias atípicas” y “micobacterias ambientales”¹⁰.

Las micobacterias no tuberculosis pertenecen al género *Mycobacterium* perteneciente al orden Actinomycetales. Es una bacteria aerobia, no esporulada, no móvil, no ramificada. Su colonia varía en morfología dependiendo de la especie. Pueden ser pigmentadas o no pigmentadas⁸.

Existen más de 150 especies de micobacterias no tuberculosas causantes tanto de infecciones pulmonares como extrapulmonares. En los años 1950´s los reportes por MNT incrementaron gracias a la identificación por cultivos, a pesar de esto se considera una infección rara 1-2/100 000 habitantes⁸. A medida que han evolucionado los métodos para la tipificación de cepas, en especial las nuevas técnicas de diagnóstico molecular; la primera clasificación de 1959 realizada por Runyan (la cual las dividía por su crecimiento en medios de cultivo en menor a 7 días y mayor a 7 días, por su pigmentación con luz ultravioleta en fotocromógenas y escotocromógenas), quedo obsoleta. A pesar de esto siguen siendo clasificadas como de lento y rápido crecimiento^{8, 10, 17}.

Las MNT comparten características comunes, entre las que destacan: 1) su pared celular rica en lípidos complejos como ácidos micólicos; 2) genoma rico en guanina y citosina (65%); 3) son patógenos facultativos; 4) sin evidencia de transmisión persona-persona; 5) algunas especies de MNT son mundiales y otras tiene una distribución geográfica restringida; 6) el tratamiento es difícil y varía de acuerdo al organismo y sitio de enfermedad y 7) la patogénesis aún no está del todo definida; esta depende de la interacción entre el microorganismo y la respuesta inmune del huésped^{8, 15}.

Las infecciones por MNT están consideradas como una enfermedad re-emergente; al contar con tratamientos más efectivos para *Mycobacterium Tuberculosis* (MTb),

además del inicio de cultivos a principios de los años 1950s, se descubrió que muchos de los casos catalogados como infección por MTb en realidad se debían a infección por MNT, dando como resultado un incremento en su prevalencia¹. Dicho incremento ha sido independiente de la epidemia por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); sin embargo, si se ha relacionado con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Este aumento en prevalencia e incidencia a nivel mundial de las enfermedades producidas por MNT se ha reportado incluso en personas sin factores de riesgo previamente asociados a estas infecciones^{3,10}.

Se considera a estos microorganismos como ubicuos ya que se encuentran en cualquier parte del medio ambiente, pueden aislarse de tierra, agua (incluso almacenada adecuadamente), polvo, leche, varios animales y aves^{11, 16}. La epidemiología puede complicarse por la frecuencia de aislamientos de MNT de bronoscopios y por lo tanto de lavados bronquio alveolar, además de no ser de reporte obligatorio por parte de las autoridades de salud^{10, 11}.

Debido a que no hay evidencia de transmisión persona a persona no es necesaria la notificación de casos ni la búsqueda de contactos. Si un paciente ha sido notificado como tuberculosis debido a la presencia de BAAR en la muestra de esputo o características radiológicas, pero en el cultivo se encuentra una MNT, se debe suspender la notificación y la búsqueda de contactos, así como la quimioprofilaxis de estos. El tratamiento debe modificarse y dirigirse a MNT^{10, 11}.

La información precisa de la incidencia y prevalencia de las infecciones causadas por MNT es limitada debido a que no es de reporte obligatorio a las autoridades de salud. Pero ha sido evidente que ha habido un incremento en las infecciones causadas por MNT en la mayoría de los países en las últimas décadas¹⁰. Reportándose una incidencia de 16.6% en 1999 y 2000 en enfermedad pulmonar, que representa un incremento de 11.2% con respecto a lo encontrado en 1971 and 1972 en Estados Unidos de América (EUA)¹⁰. En Canadá, la prevalencia de aislamientos de MNT ha incrementado anualmente 8.4% entre 1997 y 2003¹².

La tasa anual de MNT en EUA es de 7.2 casos por 100,000 habitantes (95% CI, 6.6–7.8). La tasa de enfermedad pulmonar se reporta de 5.6 casos por 100,000 habitantes (95% CI, 5.0–6.1), seguido de enfermedad de piel y tejidos blandos con

una tasa de 0.9 por 100,000 habitantes (95% CI, 0.7–1.1). Las tasas de enfermedad diseminada y linfadenitis son de 0.3 casos por 100,000 habitantes¹³. Tasas similares se han reportado en Europa, con la excepción de tasas extremadamente altas en la República Checa donde la minería es la industria predominante¹⁴.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias durante el periodo 2010-2012 y 2014 se encontraron 277 cepas causantes de infecciones pulmonares, de las cuales; 49 fueron *Mycobacterium bovis*, 170 *Mycobacterium avium* complex (153 *M. avium* y 17 *M. intracellulare*), 15 *Mycobacterium gordonae*, 9 *Mycobacterium fortuitum*, 11 *Mycobacterium kansasii*, 9 *Mycobacterium simiae*, 4 *Mycobacterium chelonae*, 4 *Mycobacterium abscessus*, 2 *Mycobacterium asiaticum*, 1 *Mycobacterium celatum*, 1 *Mycobacterium mucogenicum* y 2 *Mycobacterium sherrisii* (figura 1). Se obtuvieron en su mayoría de muestras de expectoración, lavado bronquiolo-alveolar, biopsias transbronquiales y pulmonares; de 195 pacientes.⁹.

Existen numerosas especies de MNT y debido a que se han desarrollado métodos moleculares se conocen aún más. Las especies mayormente asociadas a enfermedad son del complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium marinum*^{9, 14}. Siendo MAC la MNT más frecuentemente aislada a nivel mundial y la causa más común de enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas. Además de encontrarse en las formas más graves (diseminadas), mismas que ocurren con mayor frecuencia en pacientes con VIH y en pacientes con anomalías en el receptor de interleucina 12 (IL-12) e interferón gama (IFN- γ)¹. Otras MNT patógenas para el humano incluyen *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, y *Mycobacterium fortuitum*^{10, 14}.

La enfermedad pulmonar, linfadenitis y la infección diseminada son los problemas clínicos más importantes¹¹. Alrededor del 80-90% de los casos involucran el sistema pulmonar, el resto involucra los ganglios linfáticos, piel, tejido blando y óseo¹⁰. En niños, la linfadenitis periférica es la forma clínica de presentación más frecuente, en especial en los menores de 5 años de edad¹⁰.

Las manifestaciones pulmonares son las más comunes, se adquieren por inhalación directa. Existen alteraciones pulmonares e inmunocompromiso que predisponen a su colonización e infección dentro de las cuales destacan: SIDA, inmunodeficiencias congénitas, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), bronquiectasias, neumoconiosis, Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa (EPID), secuelas de tuberculosis, enfisema, cáncer pulmonar y enfermedades genéticas como fibrosis quística⁸. Sin embargo en los últimos 20-25 años se ha demostrado un incrementado principalmente en mujeres delgadas posmenopáusicas sin factores de riesgo específicos e individuos inmunocompetentes. Sin embargo no se cuentan con datos precisos tanto en inmunocomprometidos ni inmunocompetentes^{1,3, 10}.

Las principales micobacterias no tuberculosas que infectan a nivel pulmonar son: Micobacterium Avium Complex (MAC): las cuales incluyen *M. avium* y *M. intracellulare*; *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, entre otras menos comunes como: *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. fortuitum* y *M. abscessus* (estas últimas principalmente asociadas a bronquiectasias y fibrosis quística)⁸.

Otras manifestaciones clínicas habituales son: la linfadenitis; generalmente afecta a individuos inmunocompetentes, con afección más común a nivel cervical o submandibular. Afectando principalmente a niños menores de 12 años con un 90% de MNT y solo un 10% MTb. Las formas diseminadas son más comunes en individuos inmunodeprimidos (VIH, inmunodeficiencias primarias, cáncer, uso de corticoesteroides), siendo el MAC la forma infectante más frecuente. Otra forma clínica es la infección en piel y tejidos blandos generalmente causadas por *M. ulcerans* y *M. marinum* manifestándose hasta en un 60% con lesiones maculopapulares en manos y dedos. Actualmente está surgiendo un grupo de micobacterias de rápido crecimiento asociadas a tatuajes, liposucción e inyecciones por mesoterapia⁸.

Presentaciones pulmonares en infección por MNT

Enfermedad caviarí.- se considera una de la principales manifestaciones pulmonares, afectando principalmente lóbulos superiores (similar a infección por MTb), se ha observado predominio en edades avanzadas, sexo masculino,

antecedentes de alcoholismo y tabaquismo con alguna enfermedad pulmonar adyacente. Los síntomas principales son tos con expectoración, además de disnea, hemoptisis y síntomas generales como fatiga, pérdida de peso, fiebre y sudoraciones nocturnas^{1, 2}.

Bronquiectasias fibronodulares.- Christensen et al. reportaron que hasta el 12% de los pacientes con MNT presentaban alteraciones pulmonares con un patrón reticular más que cavitaciones. Posteriormente Prince et al. reporto que 15 de 21 pacientes sin inmunocompromiso o alteración pulmonar preexistente tenían bronquiectasias fibronodulares en ausencia de cavitaciones. Siendo denominado como síndrome de Lady Windermere en honor a la obra de Oscar Wilde que lleva el mismo nombre. Se denominó de esta manera ya que la enfermedad se observaba en mujeres mayores, atribuyéndose a que estas mujeres suprimían la tos voluntariamente; lo que provocaba un acumulo de secreciones infectadas en lóbulo medio y lingula. Las principales manifestaciones clínicas fueron tos con expectoración y hemoptisis^{1,2}.

Neumonitis por hipersensibilidad.- presentación rara, se considera en enfermedad granulomatosa desarrollada en pacientes con exposición a agua de jacuzzis y minería^{1, 2}.

Dentro de los factores más importantes para infección por MNT se encuentran las alteraciones estructurales pulmonares como: EPOC, bronquiectasias, fibrosis quística, secuelas de tuberculosis, silicosis, neumoconiosis y proteinosis pulmonar. Otros factores relacionados son la edad, sexo masculino, tabaquismo, alcoholismo, exposición a minería y fundición. Desde los años 1980's se identificó un grupo especial en el que se observaban infecciones por MNT, sin alteraciones estructurales preexistentes en pacientes no fumadores (denominado: Síndrome de Lady Windermere) y pacientes con defectos genéticos en la inmunidad celular, como mutaciones en genes de citocinas, receptores y proteínas³⁴.

Otros factores de riesgo: enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE); Thomson et al, realizo un estudio en 58 pacientes con infección pulmonar por MAC, encontrando que el diagnostico de ERGE entre pacientes de la misma edad era

mayor en cuando presentaban infección por MAC que en el grupo control (44% vs 28%; $p < 0.019$), así mismo encontró que estos pacientes presentaban indicación de inhibidores de la bomba de protones. Lo que hizo especular que la supresión de ácido gástrico incrementa el riesgo de infección por MNT al promover la supervivencia de las MNT en el ácido gástrico^{34, 35}.

Dentro de la susceptibilidad adquirida se encuentran: infección por VIH, cáncer de órganos sólidos y hematológicos (leucemia: factor más importante para infección por MNT, más que cáncer de órgano solido), también se ha observado en trasplantes de células hematopoyéticas con una incidencia de 0.4-4.9%, infectando pulmón en un 30% de los casos; se ha observado infección por MNT en pacientes con diabetes sin ser un factor independiente para la infección, encontrando infección a nivel cutáneo por *M. chelonae* en sitios de inyección de insulina, pleuritis por MAC, neumonías por *M. kansasii*, tiroiditis supurativa por MAC, etc. También se ha observado la infección en pacientes con enfermedad renal principalmente como complicación de diálisis peritoneal. El uso de antagonistas de TNF- α como infliximab y adalimumab y anticuerpos anti IFN- γ ³⁴.

Micobacterias y vitamina D

Respuesta inmunitaria innata y fagocitosis

La vitamina D es un derivado esteroide soluble en lípidos, circula en el cuerpo unida a una proteína de unión de vitamina D; globulina sintetizada en el hígado. La vitamina D requiere de dos hidroxilaciones para convertirse en su forma activa 1,25-dihidroxy vitamina D (1,25(OH)₂D), por medio de la enzima mitocondrial 1- α -hidroxilasa (CYP27B1), la primera hidroxilación es llevada a cabo en el hígado y la segunda en riñón y otras células; incluyendo células del sistema inmune¹⁸.

La vitamina D juega un papel crucial en la regulación de numerosas respuestas fisiológicas y celulares, además de ser reconocido como uno de los primeros mediadores en la homeostasis ósea, actividad antimicrobiana por medio de la activación de la respuesta inmune innata con inducción de fagocitosis, disminución de metaloproteinasas y producción de péptidos antimicrobianos como catelicidina (LL-37), los cuales exhibe actividad antimicobactericida, por lo que juegan un papel importante en el control de la infección por Mtb y MNT^{4, 5, 19, 20}. Motivo por el cual la vitamina D representa un rol importante contra de infecciones en el sistema respiratorio²⁹.

La deficiencia de vitamina D y por ende disminución en péptidos antimicrobianos (AMP's), como LL-37 se ha relacionado con predisposición para el desarrollo de una disfunción de la respuesta inmune en infecciones por Mtb y MNT^{27, 28, 30}. La deficiencia de AMP's se ha relacionado con incremento en la susceptibilidad de adquirir infección por micobacterias. Por ende estudios epidemiológicos sugieren que la deficiencia de vitamina D incrementa la susceptibilidad para infección por micobacterias tuberculosas. Así mismo estudios previos han relacionado a la deficiencia de vitamina D como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de infección por MNT a nivel pulmonar²⁷. También se ha observado que una deficiencia de CYP27B1, se relaciona con la disminución de autofagia y el desarrollo de enfermedad a nivel pulmonar³³.

MTb es un patógeno intracelular que puede interrumpir la maduración del fagosoma en células infectadas. Posterior a la inhalación, Mtb infecta macrófagos alveolares, siendo el sistema inmunitario innato la primera línea de defensa, capaz de detectar

estos agentes infecciosos a través de sus receptores (PRR's), la activación de su receptor Toll-like (TLR's) resulta directamente en actividades antimicrobianas a través de la vía de vitamina D, con la producción de LL-37 en monocitos/macrófagos^{4, 5}.

La autofagia que es una vía de catabolismo mediado por lisosomas, con la formación de fagolisosoma, es un paso esencial para la eliminación de micobacterias además de considerarse un paso clave en la resistencia de las mismas^{4, 5}.

La respuesta celular de la forma activa de vitamina D (1,25[OH]₂D) interactúa con el receptor de vitamina D intracelular (VDR), el cual modula la expresión e múltiples genes. La respuesta génica se da al unirse el complejo 1,25[OH]₂D/VDR con el receptor retinoide X. Este heterodimero regula directamente la transcripción al unirse al elemento de respuesta a vitamina D (VDRE). La respuesta no génica está asociada con la regulación de procesos celulares como la diferenciación de células mieloides^{4, 5}.

Los mecanismos antimicrobianos inducidos por vitamina D para la eliminación micobacteriana se dan por:

1. Activación de péptidos antimicrobianos como LL-37 a través de la unión del heterodimero 1,25[OH]₂D/VDR con los sitios de VDRE en el promotor de LL-37.
2. Mecanismo alternativo no genómicos como la vía de señalización VDR-fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K). Esta vía es activada por 1,25[OH]₂D en monocitos humanos, con actividad antimicobacterial. Además de la activación de NADPH-oxidasa y la producción de radicales libres de oxígeno necesarios para la actividad antimicorbiana inducida por 1,25[OH]₂D^{4, 5}.

Los péptidos antimicrobianos: catelicidina, defensinas e histatinas.

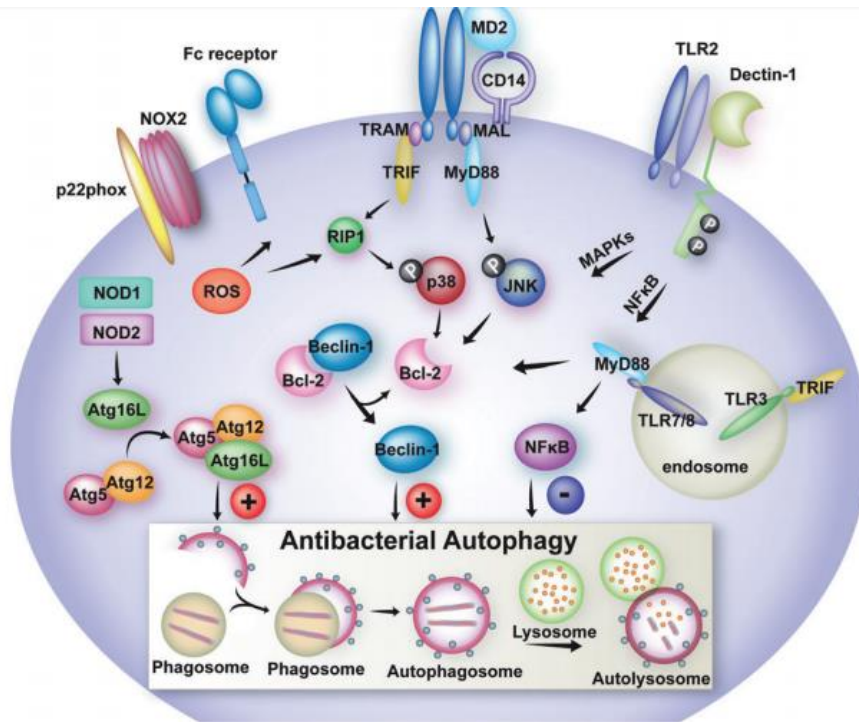
La proteína catiónica antimicrobial humana (hCAP-18)/LL-37 es el único miembro de la familia de catelicidinas identificado en el ser humano^{4, 5}. La activación de receptores de membrana TLR2/1 en los mocitos por medio de 1,25[OH]₂D es crucial para la producción de LL-37. Estas tienen múltiples roles: como medidores de la

respuesta inmune, quimioatracción, neutralización de LPS y promoviendo la reepitelización. LL-37 es expresada por múltiples células incluyendo células epiteliales (A549), macrófagos alveolares, neutrófilos y monocitos. Con la mayor expresión de LL-37 en macrófagos alveolares³⁰. Se ha demostrado que LL-37 presenta un espectro antimicrobiano entre algunas especies de gram negativos y gram positivos. El gen de AMP es un blanco específico del receptor de vitamina D (VDR) y es regulado por numerosas células como neutrófilos, macrófagos y células epiteliales por medio de 1,25[OH]₂D, dando como resultado LL-37³⁰.

Recientemente se ha encontrado que la enzima NADPH-oxidasa y especies reactivas de oxígeno son esenciales en la inducción de la expresión de LL-37 en monocitos humanos tratados con 1,25[OH]₂D después de la infección con MTb. Otro mecanismo postulado es por medio de interleucina (IL)-15^{6,7}.

Estudios indican que el reconocimiento microbiano de TLR2 y la activación celular resulta en la inducción de B-defensina 2, este péptido al igual que LL-37 participa en la inmunidad innata. La expresión de la fracción humana de B-defensina 4 requiere tanto de la activación de TLR2/1-mediado por IL-1b y VDR^{4, 5}.

La autofagia es parte de la inmunidad innata que se desencadena posterior al reconocimiento de antígenos micobacterianos.



Modificado. Eun-Kyeong Jo; Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy; Cellular Microbiology (2010) 12(8), 1026-1035.

Fisiológicamente o farmacológicamente la inducción de autofagia resulta en el incremento en la formación de autofagolisosomas para la eliminación de micobacterias. Existen diversas moléculas implicadas en este proceso, destaca la proteína murina Irgm1 (LRG-47) guadenosina trifosfatasa y IRGM su ortólogo humano. Además de PtdIns3P un efector de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Se ha observado que el calcio intracelular incrementa transitoriamente los niveles de PtdIns3P. Estudios recientes señalan que la autofagia ATP dependiente, es calcio dependiente. En adicción 1,25[OH]₂D induce autofagia^{4, 5}.

Los receptores Toll-like (TLR), modulan la respuesta innata, incluyendo la autofagia. Varios ligandos TLR incluyendo TLR7, son potentes inductores de autofagia^{4, 5}.

TLR2/Dectin-1 estimula a través de zimógenos el reclutamiento de autofagosomas a fagosomas y permite la unión con lisosomas. El ligando TLR7 ha demostrado ser mediado a través de MyD88^{4, 5}.

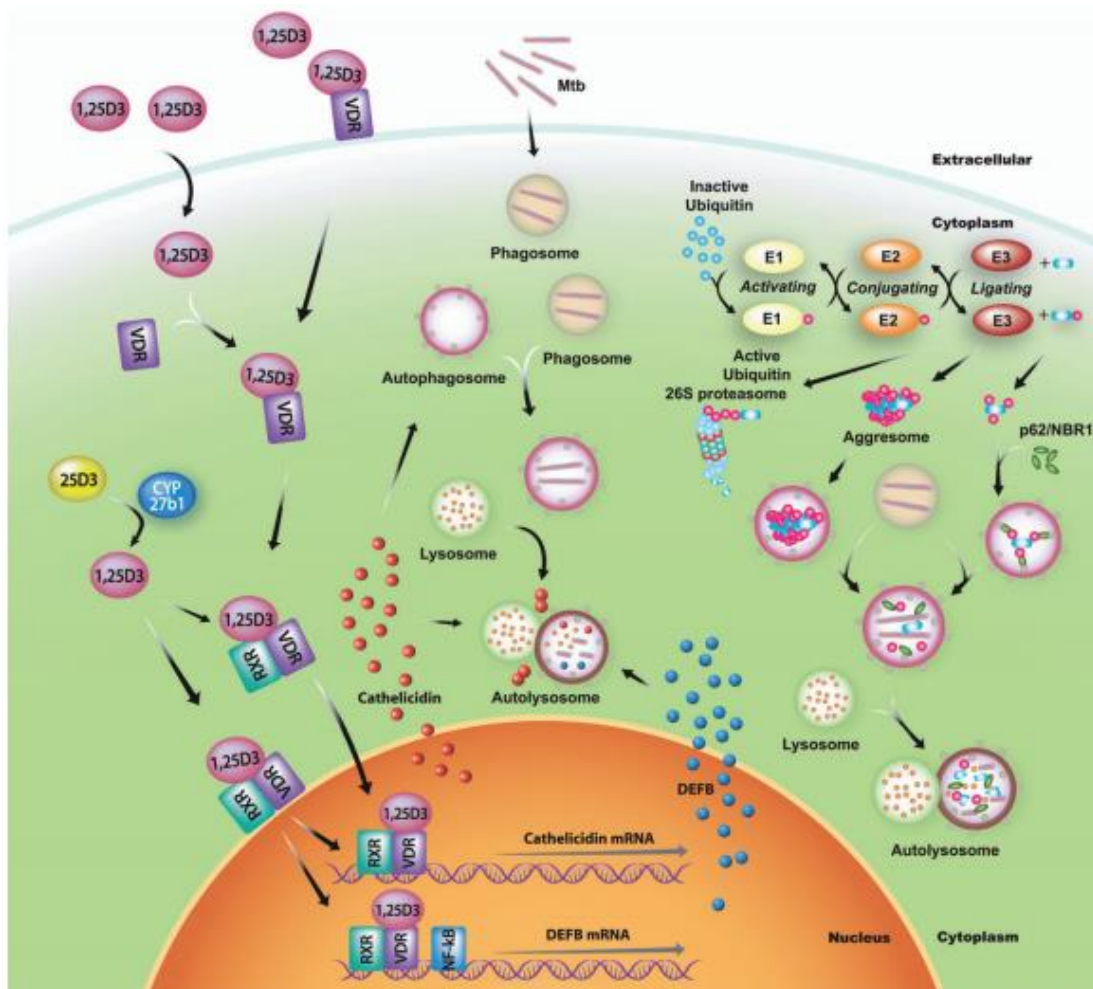
La vía de señalización TRIF-RIP1-p38 MAPK y la vía c-Jun amino terminal kinasa facilitan la activación de autofagia mediada por TLR4, ambos al final modulan la interacción entre Bcl-2 y Beclin-1 que son los reguladores de la autofagia^{4, 5}.

NF- κ B ha sido reportado como inhibidor de la autofagia en respuesta de TNF- α en líneas celulares con cáncer. Así mismo no está muy claro como inhibe la autofagia en células fagocíticas mononucleares^{4, 5}.

NADPH oxidasa (NOX2) juega un papel esencial en la regulación de la autofagia en cualquiera de las dos vía de señalización: por medio de TLR o Fc γ R^{4, 5}.

Otras vías de señalización implicadas en la regulación de autofagia son: receptor Nod-like (NLR) o CD40. Recientes estudios han demostrado que los peptidoglicanos intracelulares Nod1 y Nod2 pueden regular la autofagia y eliminar bacterias intracelulares a través del reclutamiento de ATG16L1^{4, 5}.

La autofagia representa el puente de unión entre la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. La autofagia es regulada a través de la actividad de citocinas producidas por células T. La citocina Th1 INF- γ activa la autofagia en macrófagos para eliminar MTb; así mismo las citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 inhibe la autofagia^{4, 5}.



Modificado. Eun-Kyeong Jo; Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy; Cellular Microbiology (2010) 12(8), 1026-1035.

Múltiples estudios que sugieren la interacción entre vitamina D y autofagia. Otro estudio asocia a la forma activa de la vitamina D (1,25[OH]₂D) con el incremento en los niveles de beclin-1, promoviendo la activación de la autofagia. Además se ha demostrado la necesidad de 1,25[OH]₂D para inducir autofagia en macrófagos humanos, y que el péptido antimicrobiano (hCAP-18)/LL-37 es esencial para la fusión del autofagosoma con los lisosomas. Otro péptido antimicrobiano, B-defensina 2 también es activado por 1,25[OH]₂D, teniendo actividad antimicrobiana a través de fagosomas o fagolisosomas. También existe evidencia que la vía de señalización TLR2/1 induce la producción de IL-15, la cual es necesaria para regular la producción de CYP27b1 y VDR^{6, 7}.

Unión entre ubiquitina y autofagia

La ubiquitinización envuelve la degradación de proteínas de múltiples compartimentos, denominadas 26S proteosoma. La identificación de los receptores de autofagia p62/SQSTM1 (p62) y NBR1 contribuyen a la degradación autofagosomal selectiva.

Estudios recientes enfatizan la importancia de p62 como el mediador más importante de xenofagia (que es un tipo de autofagia que envuelve y degrada patógenos intracelulares). Así mismo es crucial en la eliminación de micobacterias^{4, 5}.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vitamina D es un derivado esteroide soluble en lípidos, circula en el cuerpo unida a la proteína de unión de la vitamina D, globulina sintetizada en el hígado. La vitamina D requiere de dos hidroxilaciones para convertirse en su forma activa 1,25-dihidroxy vitamina D (1,25(OH)₂D), la primera hidroxilación es llevada a cabo en el hígado y la segunda en riñón y otras células; incluyendo células del sistema inmune¹⁸.

La vitamina D modula una gran variedad de sistemas regulatorios incluyendo mecanismos de defensa, inflamación y reparación celular¹⁹. Además incrementa la expresión del péptido antimicrobiano catelicidina (LL-37), el cual exhibe actividad antimicobactericida y juega un papel importante en el control de la infección por *M. tuberculosis* (Mtb) y otras micobacterias²⁰.

La deficiencia de vitamina D se ha relacionado con predisposición a desarrollar disfunción de la respuesta inmune en infecciones por Mtb ^{27, 28}. Aunque estudios de la eficacia de la suplementación de Vitamina D en el tratamiento de la tuberculosis son inconsistentes, es decir, en algunos estudios se demostró que la suplementación de vitamina D disminuye tanto el tiempo de negativización de las baciloscopias, como de los cultivos, en contraste, en otros estudios no se demostró que la suplementación con vitamina D no tiene efecto sobre la resolución de la infección por MTb durante el tratamiento farmacológico^{21, 22, 32}. La inconsistencia de

estos resultados se ha abordado, evaluando el efecto del tratamiento farmacológicos (rifampicina e isoniazida) sobre los mecanismos inducidos por vitamina D, sin embargo, estos estudios no han aportado datos concluyentes, a lo más, han demostrado que los fármacos de primera línea alteran la producción de LL-37 inducida por vitamina D en líneas de macrófagos humanos²³. Por otro lado, nosotros abordamos la hipótesis de que los resultados inconsistentes de la suplementación de vitamina D sobre el control de la tuberculosis, puede estar asociada a que la infección es causada por “otras” Micobacterias, ya sea pertenecientes al complejo M. tuberculosis, o bien por cepas de Micobacterias no tuberculosas (MNT).

Las MNT, son ampliamente distribuidas en el ambiente, se encuentran en el aire y el suelo. La mayoría de las bacterias pertenecientes al género Micobacteria no tuberculosas son no-patogénicas, es decir, no causan enfermedad al ser humano, aunque algunas si causan enfermedad, con cuadro clínico casi indistinguible de la tuberculosis causada por cepas del complejo de Mtb. Al igual que las micobacterias del complejo Mtb son acido-alcohol resistentes y la distinción mediante el análisis de baciloscopia es indistinguible. En humanos las MNT pueden causar linfadenitis, infecciones en la piel y tejidos blandos, así como infecciones diseminadas y enfermedad pulmonar. El diagnóstico diferencial de infecciones por MTb es muy difícil desde el punto de vista clínico. En cuanto al diagnóstico microbiológico, si bien el cultivo positivo es la prueba de oro para establecer el diagnóstico, no en todos los laboratorios se cuenta con las condiciones para las pruebas diferenciales y tampoco con la disponibilidad de las nuevas pruebas moleculares que permiten un diagnóstico diferencial temprano. Desde el punto de vista epidemiológico, se desconoce la frecuencia de la infección de MNT como causa de enfermedad en individuos inmunocompetentes y suele ser diagnosticada como tuberculosis causada por cepa del complejo M. tuberculosis, o bien, propiamente por MTb y tratada farmacológicamente con los mismos medicamentos antituberculosis.

Por otro lado, desde el punto de vista inmunológico, diversos estudios han demostrado que la respuesta inmune efectiva tanto hacia MTb como a MNT es de tipo celular. Así mismo se ha relacionado a la deficiencia de AMP´s con incremento

en la susceptibilidad de adquirir la infección por micobacterias. Por ende estudios epidemiológicos sugieren que un nivel bajo de vitamina D incrementa la susceptibilidad para infección por micobacterias tuberculosas. Así mismo estudios previos han relacionado a la deficiencia de vitamina D como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de infección por MNT a nivel pulmonar²⁷. Además, diferencias en la virulencia y la inducción de respuesta inmune entre cepas de micobacterias pertenecientes al complejo MTb han sido descritas desde 1960, aunque la posibilidad de estudiar y caracterizar brotes de tuberculosis causados por una cepa en específico se logró en la década de los 90's, sobre todo por el gran desarrollo de las técnicas de genotificación. Así que, por ejemplo, fue posible la caracterización de dos cepas altamente virulentas MTb CDC1551 y HN878, donde, la cepa CDC1551 es un miembro del linaje 4, individuos infectados con esta cepa exhiben un inusual porcentaje alto de respuesta positiva a la tuberculina. También se ha demostrado que esta cepa induce niveles altos de IL-12 e IFN- γ en ratones²⁶. Por otro lado, la cepa HN878 pertenece al linaje 2, responsable de múltiples casos de tuberculosis en Texas y exhibe virulencia alta en modelos animales de la tuberculosis^{24, 25}. Se ha descrito que miembros del linaje 2 producen glicolípidos fenólicos que disminuyen la respuesta pro-inflamatoria. De tal forma que es posible observar que en la relación huésped parásito (infección-paciente), la respuesta inmune del huésped es dependiente de las características intrínsecas de las cepas de Micobacterias y que, los mecanismos inmunológicos que se desencadenan durante la infección micobacteriana no necesariamente son los mismos en los pacientes con diagnóstico de tuberculosis, y esto no solo se debe a las variaciones genéticas del huésped, sino también involucra las variaciones de las cepas micobacterianas. De tal forma, que cuando se evalúan los mecanismos inmunológicos en respuesta a la infección por MTb se olvida la pertinencia de la evaluación y estudio de las cepas participantes. Así que nosotros proponemos que los resultados inconsistentes en cuanto al papel de la vitamina D durante la infección por MTb deben examinarse a la luz de las diferencias en las cepas involucradas y la generación de la respuesta inmune inducida durante la infección. Esta hipótesis nace del pensamiento de que si bien, la vitamina D es una molécula

inmunoreguladora, entonces, cuando se administra con esta intención, inmunoregulará el mecanismo inmunológico generado durante la infección micobacteriana, de tal forma que si los mecanismos inmunológicos inducidos son diferentes y relacionados con la cepa de infección, la inmunoregulación inducida por vitamina D no tendrá los mismos resultados en todos los casos de infección y por lo tanto, no se traducirá todas las veces en un mejor control de infección, la cual se caracteriza por la inducción de mecanismos bactericidas como la producción de LL-37.

En esta propuesta evaluaremos el efecto de la adición de vitamina D sobre la producción de citocinas inflamatorias en células THP-1 infectados in vitro con 8 aislados clínicos de infección pulmonar de micobacterias, obtenidas del banco de cepas del laboratorio de microbiología clínico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis ha sido identificada como una emergencia mundial desde 1994, (WHO, 1994) y es la segunda causa de muerte ocasionada por un agente único debido a una enfermedad infecciosa curable (Organization WH. Global tuberculosis report 2016; 2016.). Se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, que es causa de enfermedad en 9.3 millones de personas por año.

En la mayoría de los casos se asume que el agente etiológico es *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), sin embargo, en los últimos años, los reportes de la infección por otras micobacterias del complejo de *M. tuberculosis* diferentes a MTb y Micobacterias no Tuberculosas (NTM) ha ido en aumento en individuos inmunocompetentes. Esto probablemente por deficiencias en los programas de control tuberculosis en el ganado y el consumo de productos lácteos sin pasteurizar en los países en desarrollo (Pensando en *M. bovis*) y también porque gracias a los desarrollos tecnológicos en el campo de la biología molecular, es posible realizar el diagnóstico molecular e identificar de forma específica el agente causal de la

enfermedad. También se ha descrito que las diferentes cepas micobacterianas inducen mecanismos inmunológicos diferentes.

Por otro lado, estudios observacionales publicados entre 1989 y el 2008, han encontrado una asociación entre los niveles bajos de vitamina D y el riesgo de progresión de la tuberculosis, reportando que los niveles séricos bajos de vitamina D se asocian a un mayor riesgo de tuberculosis activa, sugiriendo un rol potencial de la suplementación con vitamina D en pacientes con tuberculosis activa e hipovitaminosis D. Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos de la eficacia de la suplementación de Vitamina D en el tratamiento de la tuberculosis son inconsistentes, es decir, en algunos estudios se demostró que la suplementación de vitamina D disminuye el tiempo de negativización de las baciloscopias y de cultivo positivo durante el tratamiento de la tuberculosis, en contraste, en otros estudios no se demostró que la suplementación con vitamina D tenga efecto sobre la resolución de la infección por *Mtb*. A este respecto es necesario evaluar si las inconsistencias de los resultados de los estudios clínicos de administración de vitamina D están relacionados con el tipo de cepa micobacteriana responsable de la enfermedad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los efectos de la adición de vitamina D sobre la producción de citocinas inflamatorias en monocitos humanos infectados con diferentes cepas de micobacterias?

5. HIPÓTESIS

La función inmunoreguladora de la vitamina D en el tratamiento de la infección micobacteriana depende de la cepa micobacteriana involucrada en la infección, esta inmunoregulación se traduce en mayor o menor actividad bactericida en la que participa la producción de citocinas inflamatorias por macrófagos humanos.

Hipótesis nula

No existen diferencias en la producción de citocinas inflamatorias y actividad bactericida en macrófagos infectados por diferentes cepas de aislados clínicos micobacterianos suplementados con vitamina D.

6. OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de la adición de vitamina D sobre la producción de citocinas en células THP-1 infectadas in vitro con micobacterias de aislados clínicos registradas en el banco de micobacterias del laboratorio de microbiología clínica.
2. Comparar el efecto de la vitamina D sobre la producción de citocinas inflamatorias de las células THP-1 infectados con los diferentes aislados clínicos.
3. Comparar el efecto de la vitamina D sobre la producción de citocinas inflamatorias de las células THP-1 infectados con cepas del complejo Mtb, contra cepas de micobacterias no tuberculosas.
4. Determinar si existe asociación entre la producción de citocinas y las manifestaciones clínicas de los pacientes de acuerdo a la cepa de micobacteria aislada.

Objetivos secundarios:

1. Investigar las características clínicas de las cepas de MNT de los pacientes incluidos en el protocolo y comparar con la literatura.
2. Analizar las características radiológicas de las cepas de MNT incluidas en el protocolo y comparar con la literatura.

7. MATERIAL Y METODOS

Lugar del estudio: El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología clínica y el departamento de investigación en microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Las evaluaciones inmunológicas fueron realizadas en el departamento de investigación en microbiología.

Descripción de la población de estudio: Los macrófagos humanos se obtendrán a partir de monocitos obtenidos de sujetos sanos donadores al banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Procedimientos del estudio: Se seleccionaron 8 cepas de aislados micobacterianos y se realizaron cultivos masivos en medio de cultivo líquido Lowenstein Jensen para obtener concentraciones de 10^7 y 10^8 bacterias/mL. La línea celular THP-1 se obtuvo de la ATCC y será utilizada como macrófagos de referencia, donde no existe efecto de fondo de niveles séricos de vitamina D y la estandarización de las condiciones de cultivo se realizará con estas células.

La bacteria virulenta *M. tuberculosis* H37Ra y/o H37Rv se adquirieron de la ATCC y fueron utilizadas como cepa de referencia.

Tamaño de muestra: Se realizará un mínimo de 6 ensayos (en triplicado) para cada uno de los aislados clínicos y en el caso de la línea celular THP-1. Se administrará Vitamina D [forma activa (1,25[OH]₂D)], se realizará una curva dosis de vitamina D en la línea THP-1. La producción de citocinas inflamatorias: IL-1 β , IL-2, IL4, IL5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , MPC-1, G-CSF, GM-CSF y MIP-1 β . de células THP-1, se determinó mediante ensayos de Luminex.

Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo.

La concentración de las citocinas de IL-1 β , IL-2, IL4, IL5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , MPC-1, G-CSF, GM-CSF y MIP-1 β . de células THP-1, en sobrenadantes de los cultivos de MDM infectados in vitro con *M. tuberculosis* y se determinarán por la técnica de Luminex, utilizando el kit..... Brevemente, sensibilizar una placa de 96 pozos Maxisorp con el primer anticuerpo.

Análisis estadístico

Las variables de los resultados se describieron como medias y error estándar. Las pruebas de hipótesis se hicieron con prueba T para dos muestras. Se considerarán como significativas aquellas diferencias con una $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 14.0.

8. IMPLICACIONES ÉTICAS

El tipo de riesgo deberá ser considerado de acuerdo a lo establecido en el Art. 17 del REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud:

- Investigación sin riesgo
- Investigación con riesgo mínimo
- Investigación con riesgo mayor que el mínimo.

La realización de esta propuesta no representa riesgo para los voluntarios participantes (de hecho, se utilizarán paquetes leucocitarios del banco de sangre del Instituto). El riesgo que presenta la realización de esta propuesta es de naturaleza biológico infeccioso, pues se estarán procesando cepas infecciosas de micobacterias de aislados clínicos. Para minimizar los riesgos la infección in vitro se realizará dentro de las instalaciones del laboratorio de seguridad biológica del departamento de microbiología clínica. La responsable del proyecto conoce las medidas de bioseguridad y ha recibido el entrenamiento para el manejo de cepas de *M. tuberculosis* virulentas. En el caso de procesar muestras de sobrenadantes de cultivo fuera de las instalaciones del laboratorio de seguridad biológica, los sobrenadantes de cultivo se filtrarán con membranas de 0.22mm antes de salir del laboratorio de bioseguridad y serán procesados en el laboratorio de contención instalado en el departamento de investigación en microbiología. Todas las muestras serán mantenidas de acuerdo a las medidas de contención y biocustodia.

9. RESULTADOS

9.1. Frecuencia de cepas en aisladas en Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Se realizó una búsqueda de incidencia de cepas de micobacterias diferentes a *M. tuberculosis*, incluyendo otras micobacterias del complejo Mtb y MNT, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Se incluyeron las cepas aisladas de los años 2010, 2011, 2012 y 2014.

Durante el periodo 2010-2012 y 2014 se encontraron 277 cepas causantes de infecciones pulmonares, de las cuales; 49 fueron *Mycobacterium bovis*, 170 *Mycobacterium avium complex* (153 *M. avium* y 17 *M. intracellulare*), 15 *Mycobacterium gordonae*, 9 *Mycobacterium fortuitum*, 11 *Mycobacterium kansasii*, 9 *Mycobacterium simiae*, 4 *Mycobacterium chelonae*, 4 *Mycobacterium abscessus*, 2 *Mycobacterium asiaticum*, 1 *Mycobacterium celatum*, 1 *Mycobacterium mucogenicum* y 2 *Mycobacterium sherrisii* (figura 1). Se obtuvieron en su mayoría de muestras de expectoración, lavado bronquiolo-alveolar, biopsias transbronquiales y pulmonares; de 195 pacientes.

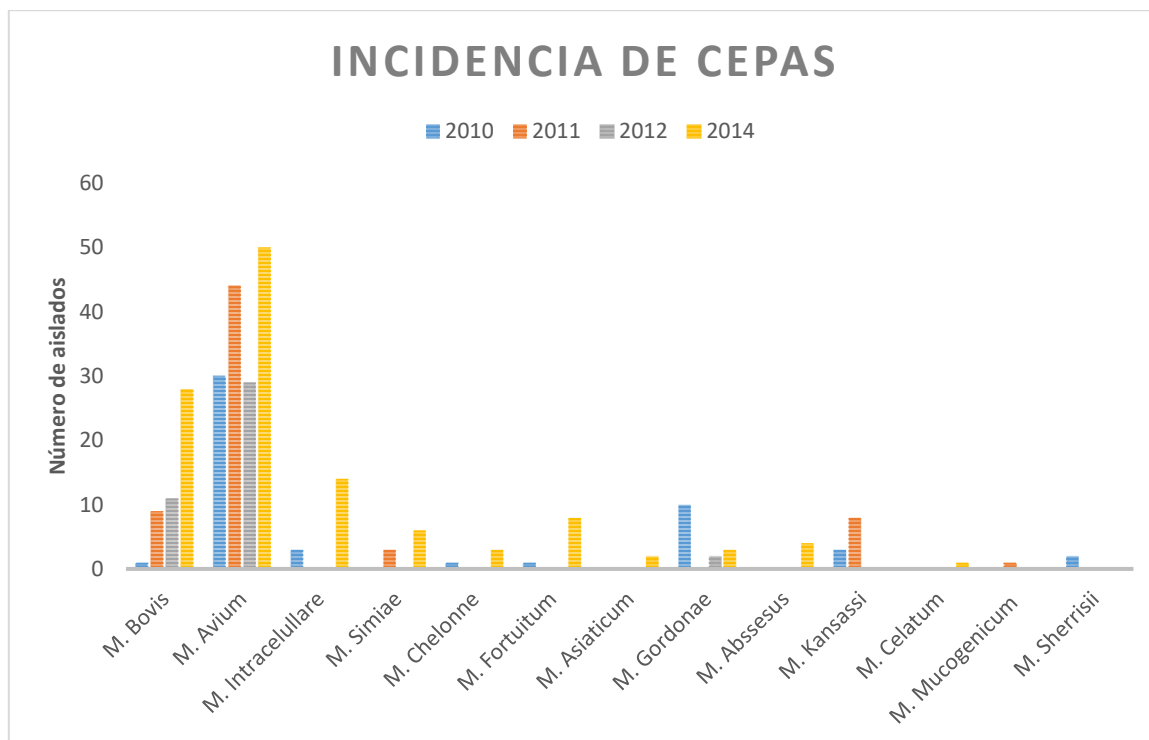


Figura 1. Incidencia de cepas obtenidas de infecciones pulmonares en Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Las barras muestran la incidencia por año de las diferentes cepas.

Observamos un incremento en la detección de micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* en el año 2014; del total de la muestra analizada se detectó un 42.9% respecto a 18.4% observado en el año 2010, muy probablemente por los nuevos estudios diagnósticos moleculares implementados (figura 2).

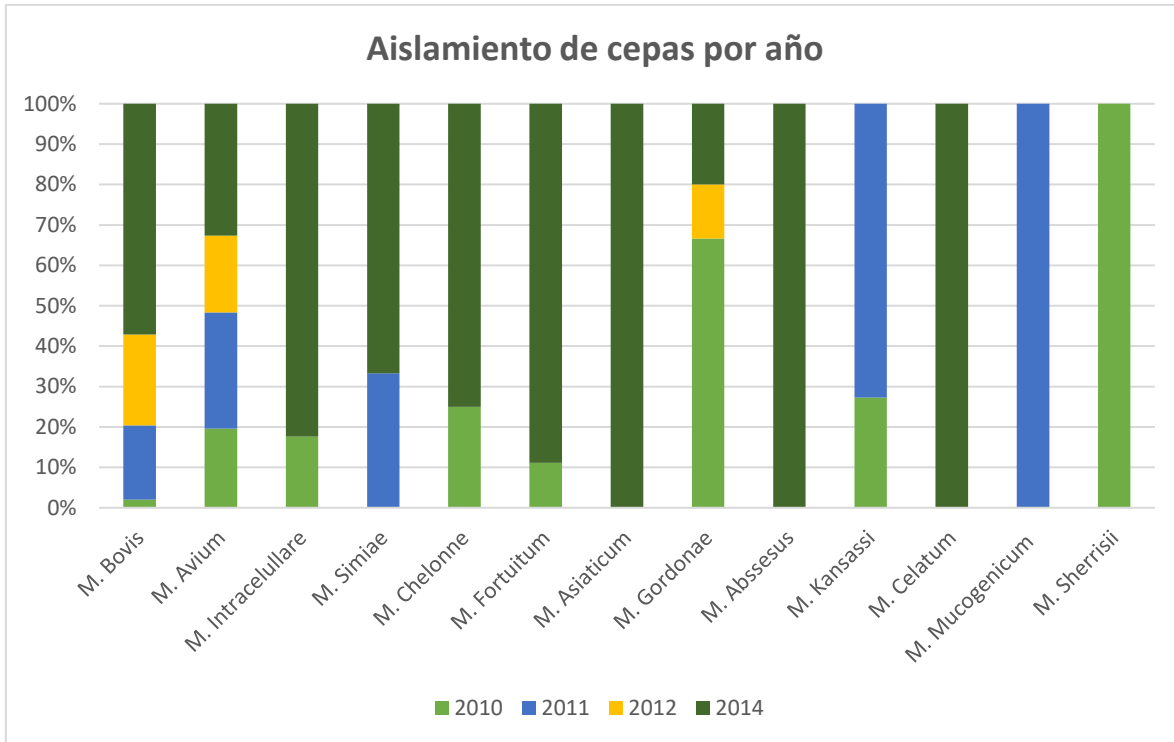


Figura 2. Porcentaje de cepas obtenidas de infecciones pulmonares en Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Las barras muestran el porcentaje por año de las diferentes cepas.

Así mismo, se encontró que las cepas más frecuentemente aisladas diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* son: *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*, seguida de *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium gordonae*.

9.2. Selección y crecimiento de cepas de micobacterias

Se incluyeron 2 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*; 2 cepas de *Mycobacterium avium*, 2 cepas de *Mycobacterium simiae*, 2 cepas de *Mycobacterium bovis* y la cepa de referencia Mtb. H37Ra (tabla 1). Las cuales fueron cultivadas en condiciones de bioseguridad, para alcanzar concentraciones de cultivo de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias por mililitro.

9.3 Características clínicas y demográficas de los pacientes con diagnóstico de infección por micobacterias de las cepas estudiadas.

De las cepas estudiadas: 4 cepas fueron aisladas de pacientes del sexo hombre (50%) y 4 cepas fueron aisladas de mujeres (50%), con una media de edad 42.25 años (37-68 años). Dentro de los factores de riesgo más importantes identificados, se encontraron infección por VIH en el caso de los dos pacientes infectados por *Mycobacterium avium*, desnutrición severa en los pacientes infectados por cepas de *Mycobacterium Simiae* y Diabetes Mellitus tipo 2 en un paciente infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. Siendo en su mayoría pacientes inmunocompetentes. De las características radiológicas estudiadas los patrones radiográficos más comúnmente encontrados fueron micronódulo, cavitaciones y bronquiectasias; sin alguna distribución a nivel de parénquima pulmonar en específico (Imagen 1, 2, 3 y 4).

9.4 Producción de citocinas en respuesta a la infección con micobacterias de aislados clínicos.

Posterior a la infección de monocitos humanos se cuantificó la producción de 17 citocinas; de infección de células THP-1 con medio. Donde pudimos observar un incremento superior en la producción de TNF- α e IL-1 β , comparada con las demás citocinas estudiadas (Figura 3), así mismo se observó una variabilidad en la producción de las citocinas antes mencionadas dependiendo de la cepa estudiada (Figura 4).

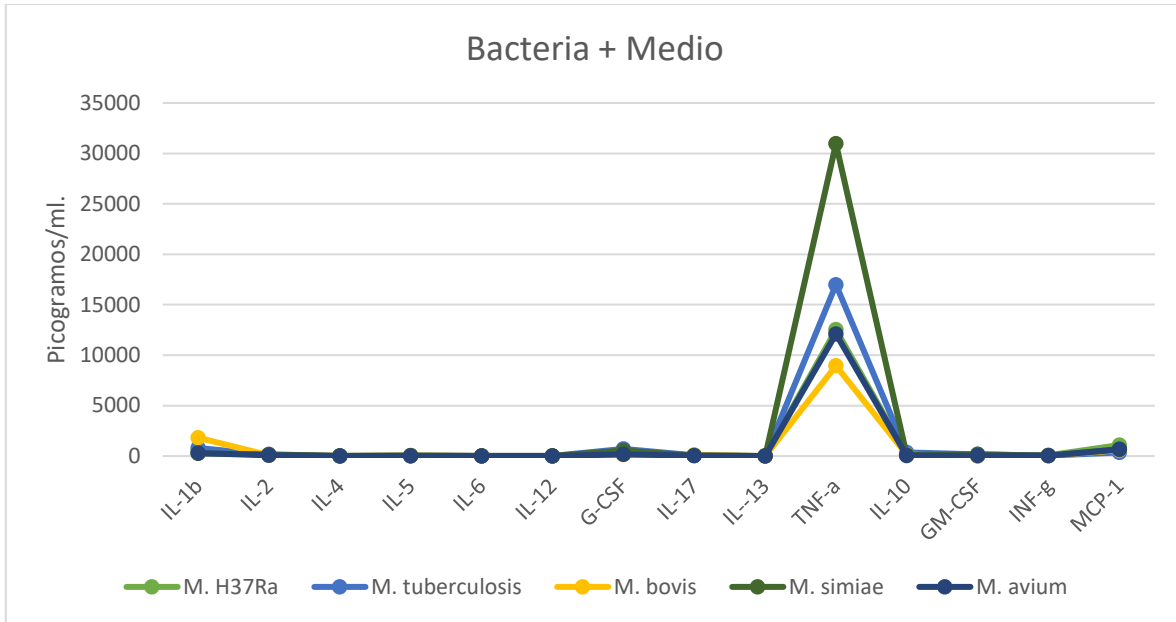


Figura 3. Producción de citocinas en células THP-1 infectadas con la cepas M. H37Ra, Mtb, M. bovis, M. simiae y M. avium, medido en picogramos/ml. Donde se puede apreciar una mayor producción en citocinas: IL-1 β y TNF- α .

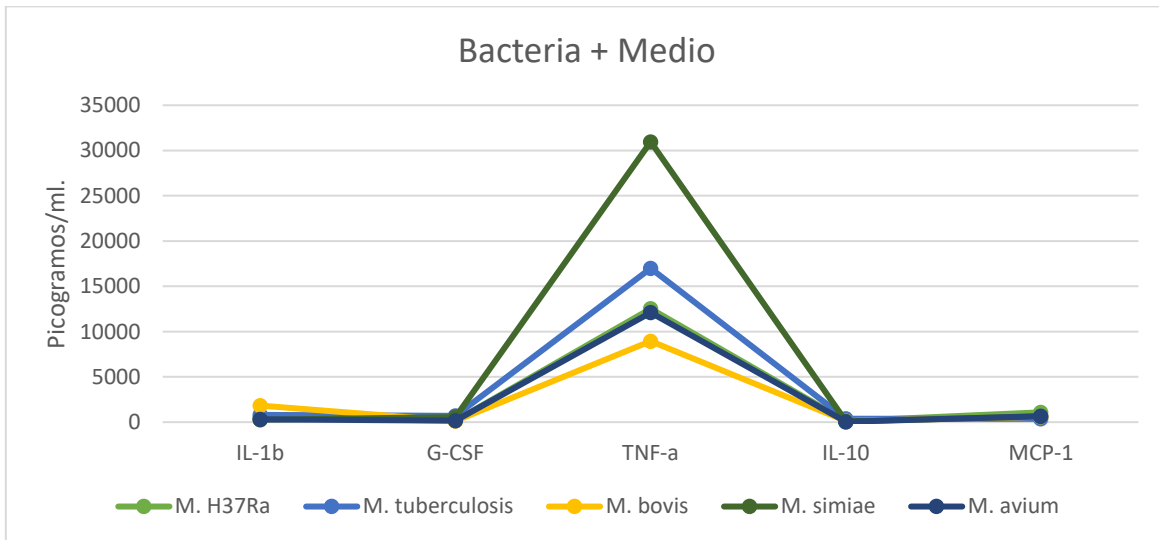


Figura 4. Producción de citocinas en células THP-1 infectadas con la cepas M. H37Ra, Mtb, M. bovis, M. simiae y M. avium, medido en picogramos/ml. Esta grafica muestra la variabilidad en la producción de citocinas que se encontraban fuera de rango: TNF- α e IL-1 β , en la que se puede apreciar la variabilidad en su producción dependiendo de la cepa estudiada.

Así mismo, se observó una variabilidad en la producción de las citocinas en células THP-1 infectadas con las cepas M. H37Ra, Mtb, M. bovis, M. simiae y M. avium. Principalmente en IL-2, G-CSF, IL-17, IL-10, GM-CSF e IFN- γ (Figura 5).

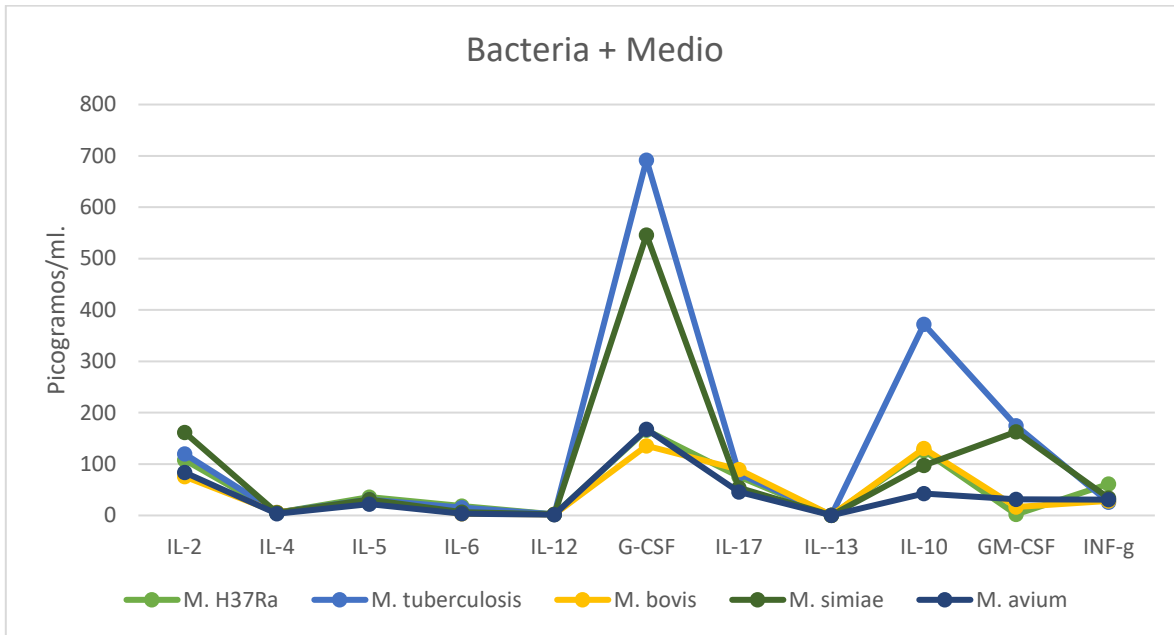


Figura 5. Producción de citocinas en células THP-1 infectadas con las cepas M. H37Ra, Mtb, M. bovis, M. simiae y M. avium, medido en picogramos/ml. Esta grafica no muestra la producción de citocinas que estaban fuera de rango. TNF- α e IL-1 β .

5.5. Efecto de la vitamina D sobre la producción de citocinas de células THP-1 infectadas con las cepas de micobacterias de aislados clínicos.

Posterior a la infección de monocitos humanos se cuantifico la producción de 17 citocinas; comparando infección de células THP-1 con medio y en presencia de 10 nM de vitamina D.

La vitamina D induce incremento en de la producción de IL-1 β , IL-2, IL4, IL5, IL-6, IL-12, G-CSF, IL-17, IL-13 y TNF- α de células THP-1 infectadas con cepas de micobacterias (tabla 2).

La vitamina D induce incremento en la producción de IL-5 en células THP-1 infectadas con todas las cepas de micobacterias de los aislados clínicos estudiados. (Figura 6).

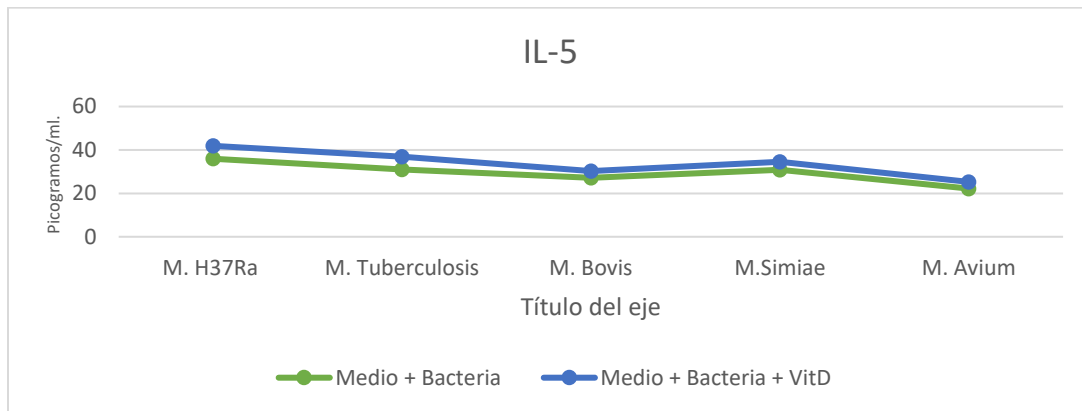


Figura 6. Efecto de vitamina D en la producción de IL-5 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-1 β en células HTP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. bovis*, *M simiae* y *M. avium*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con M.H37Ra (Figura 7).

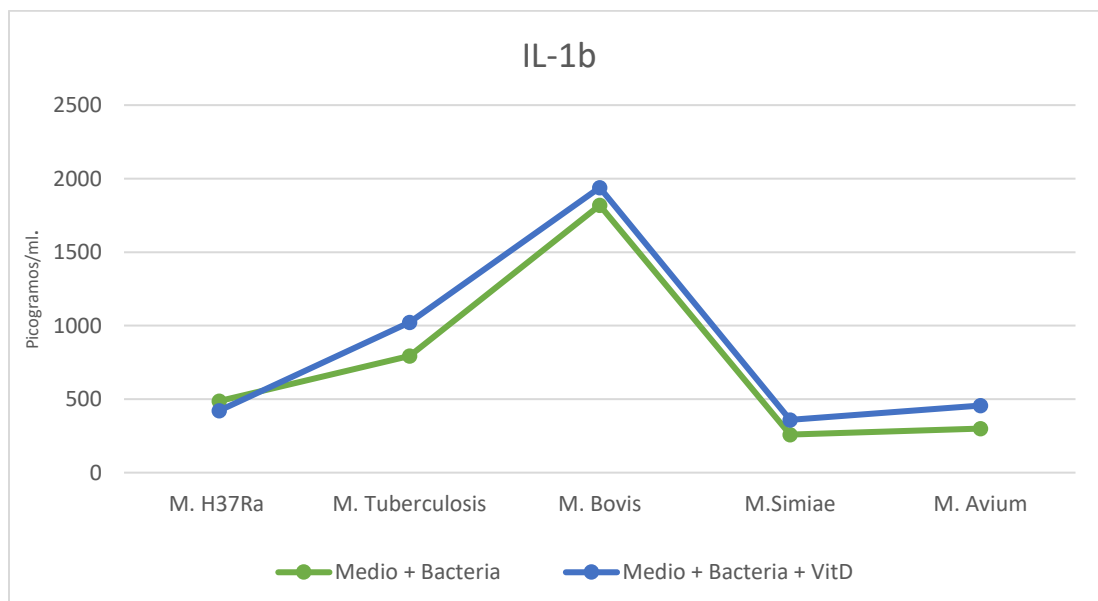


Figura 7. Efecto de vitamina D en la producción de IL-1 β en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-2 en células HTP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. bovis*, *M simiae* y *M.H37Ra*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con *M. avium* (Figura 8).

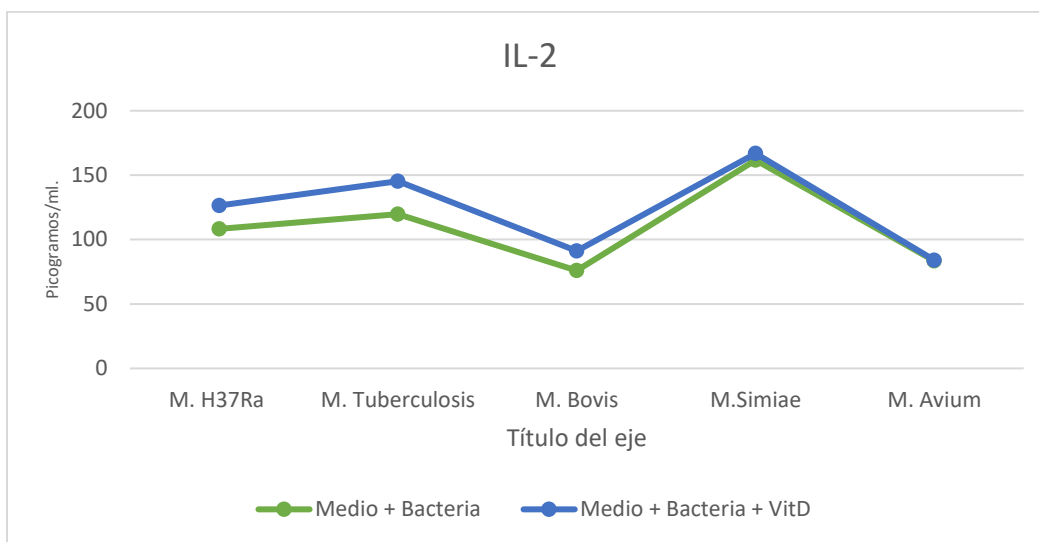


Figura 8. Efecto de vitamina D en la producción de IL-2 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-4 en células HTP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. bovis*, *M simiae* *M. avium* y, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con *M.H37Ra* (Figura 9).

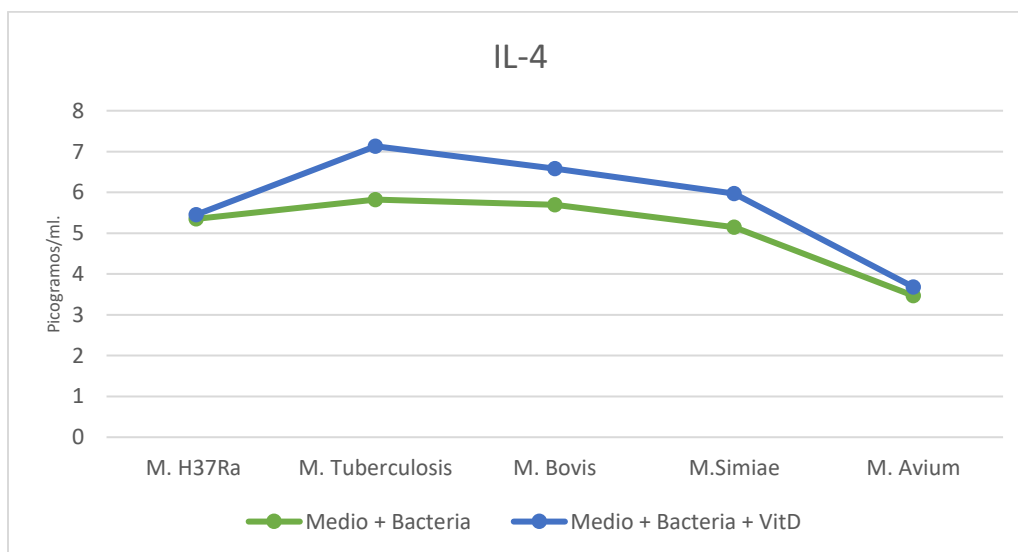


Figura 9. Efecto de vitamina D en la producción de IL-4 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-6 en células HTP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. bovis* y *M.H37Ra*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con *M simiae* y *M. avium* (Figura 10).

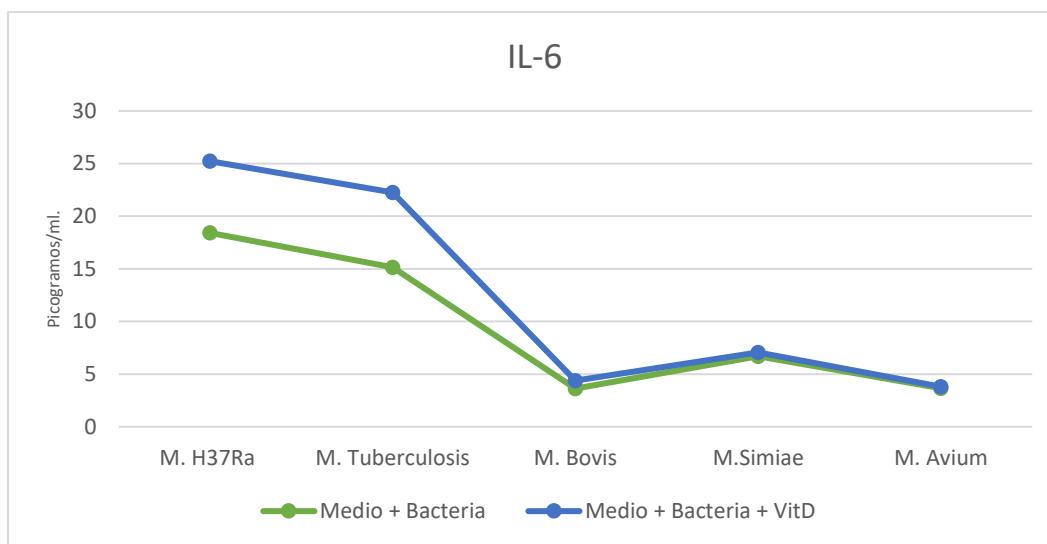


Figura 10. Efecto de vitamina D en la producción de IL-6 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-12 en células HTP-1 infectadas por cepas *MH37Ra*, *Mtb*, *M simiae* y *M. avium*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con *M. bovis* (Figura 11).

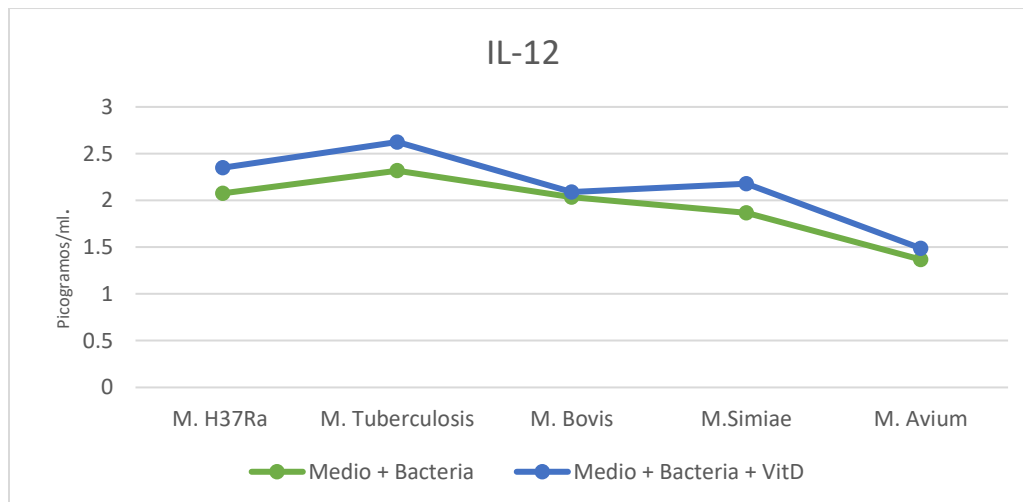


Figura 11. Efecto de vitamina D en la producción de IL-12 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-17 en células HTP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. bovis*, *M. simiae* y *M. avium* y, en contraste, la vitamina D indujo disminución en la producción de células infectadas con M.H37Ra (Figura 12).

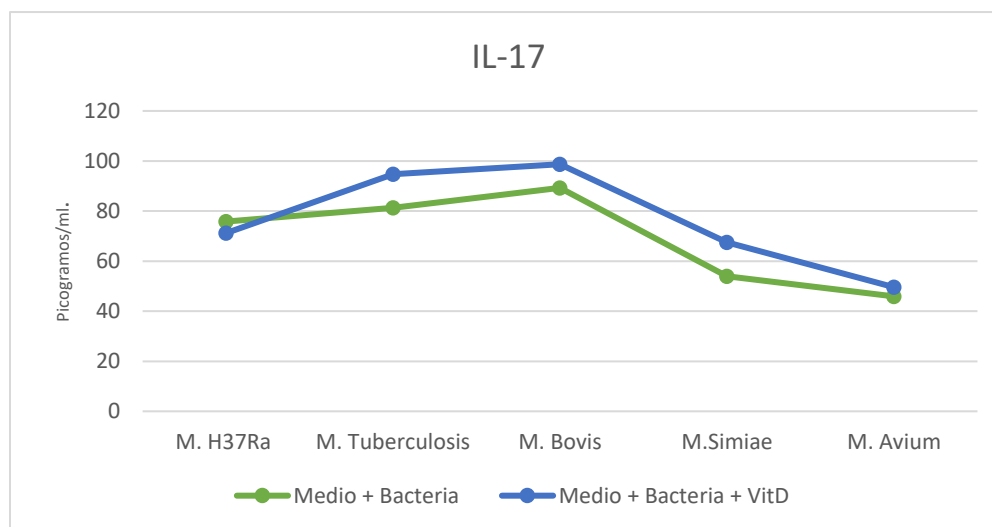


Figura 12. Efecto de vitamina D en la producción de IL-17 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) en células HTP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. bovis* y *M. simiae*; siendo considerablemente elevada en *Mtb*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas M.H37Ra (Figura 13).

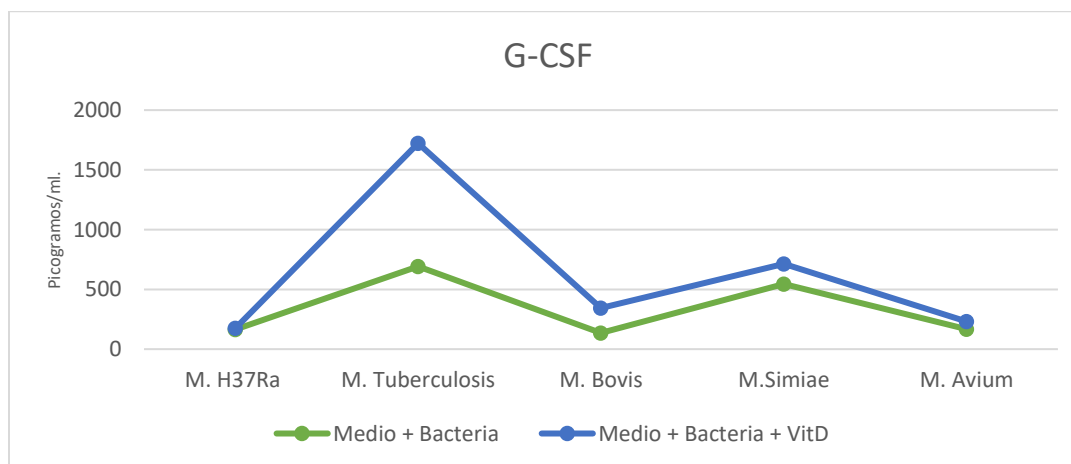


Figura 13. Efecto de vitamina D en la producción de G-CSF en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de IL-13 en células THP-1 infectadas por cepas *Mtb*, *M. simiae* y *M. avium*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con *M. bovis*, con una disminución en su producción con *M.H37Ra* (Figura 14).

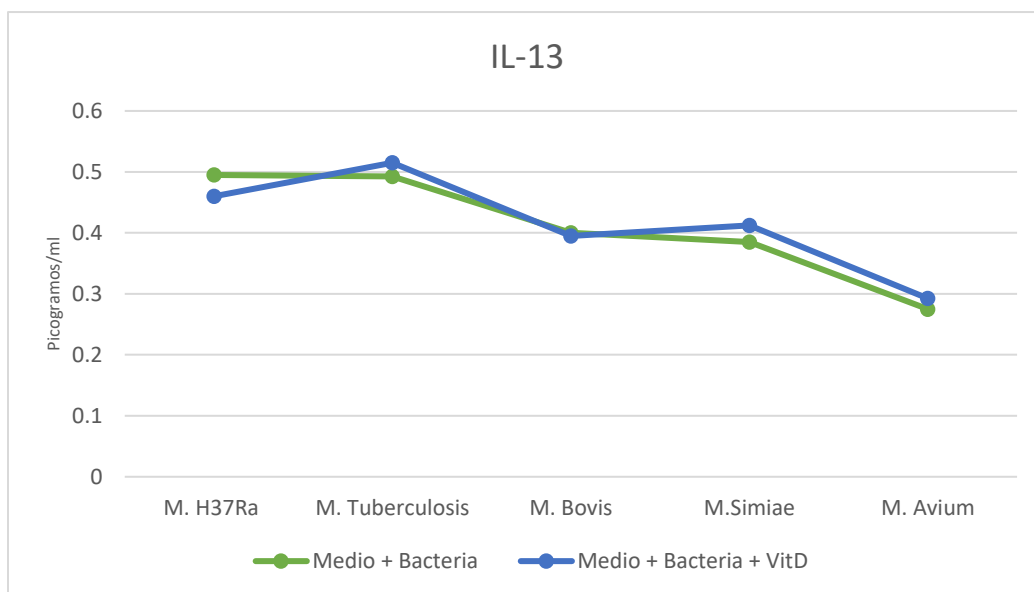


Figura 14. Efecto de vitamina D en la producción de IL-13 en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D induce un incremento en producción de TNF- α en células THP-1 infectadas por cepas *M.H37Ra*, *Mtb* y *M. bovis*, en contraste, la vitamina D no induce incremento en la producción de células infectadas con *M. simiae* y *M. avium* (Figura 15).

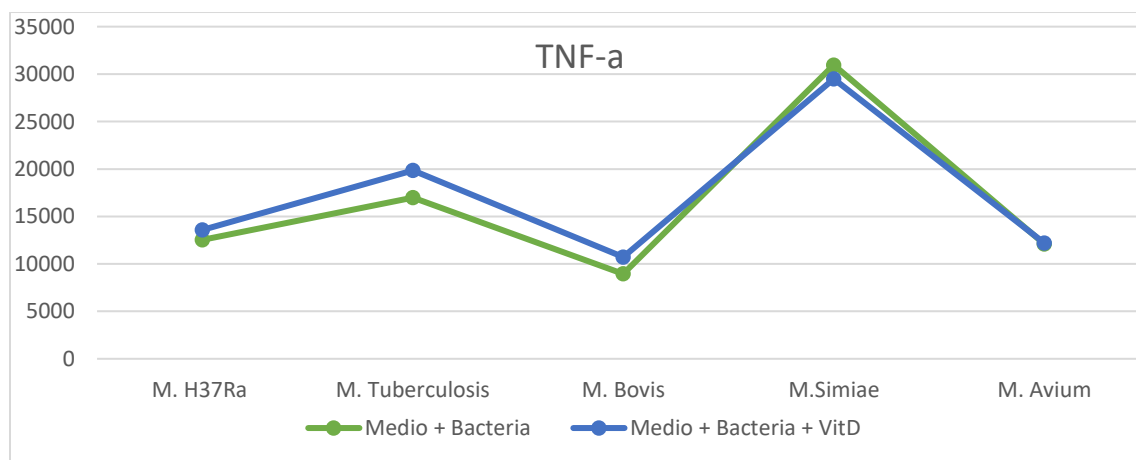


Figura 15. Efecto de vitamina D en la producción de TNF- α en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

La adición de vitamina D no mostro un incremento en producción de IFN- γ en células HTP-1 infectadas cepas *Mtb*, *M. bovis*, *M. simiae* y *M. avium* (Figura 16).

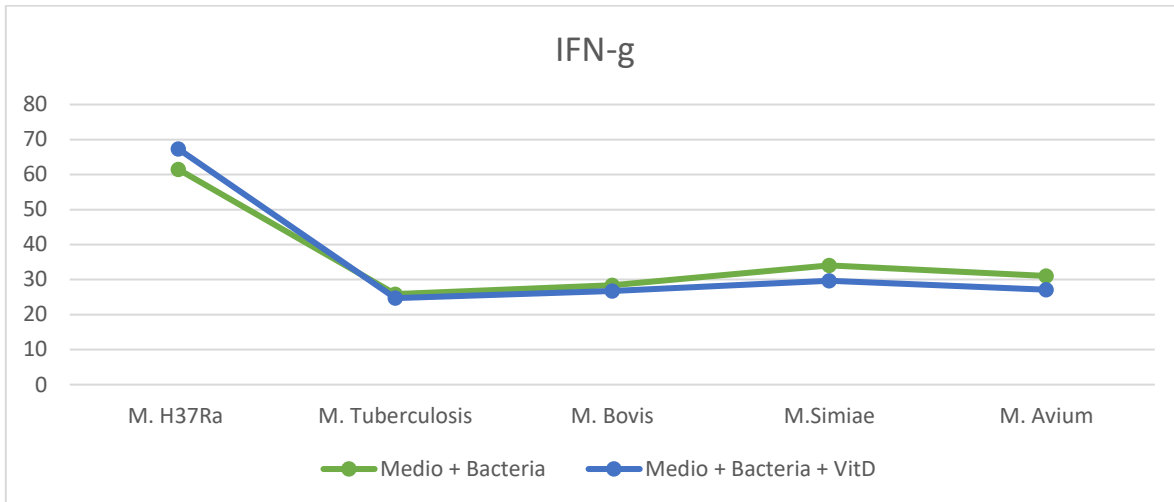


Figura 16. Efecto de vitamina D en la producción de IFN- γ en células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias.

Mtb presento mayor actividad en cuanto a la producción de citocinas con la adición de vitamina D, comparada con otras micobacterias. Así mismo se observó mayor producción de TNF- α , G-CSF e IL-1 β . (Figura 17 y 18).

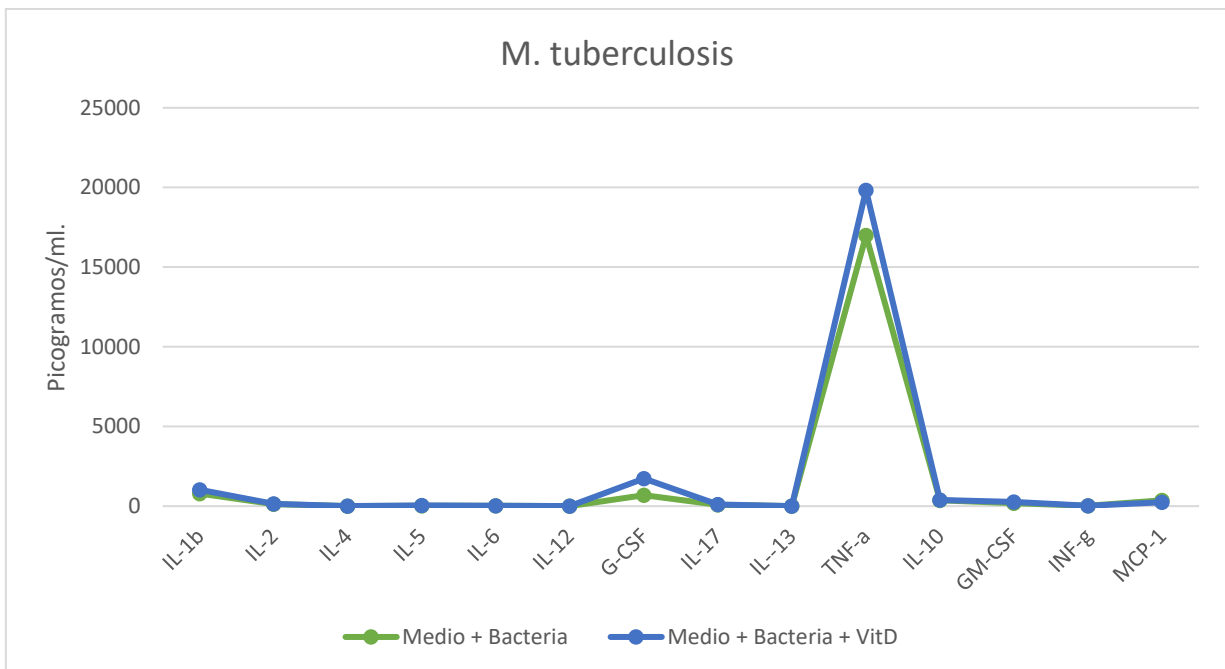


Figura 17. Efecto de la vitamina D sobre la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con la cepa *M. tuberculosis*. Donde se aprecia mayor actividad en la producción de las citocinas al adicionar con vitamina D. En especial TNF- α , G-CSF- α e IL-1 β .

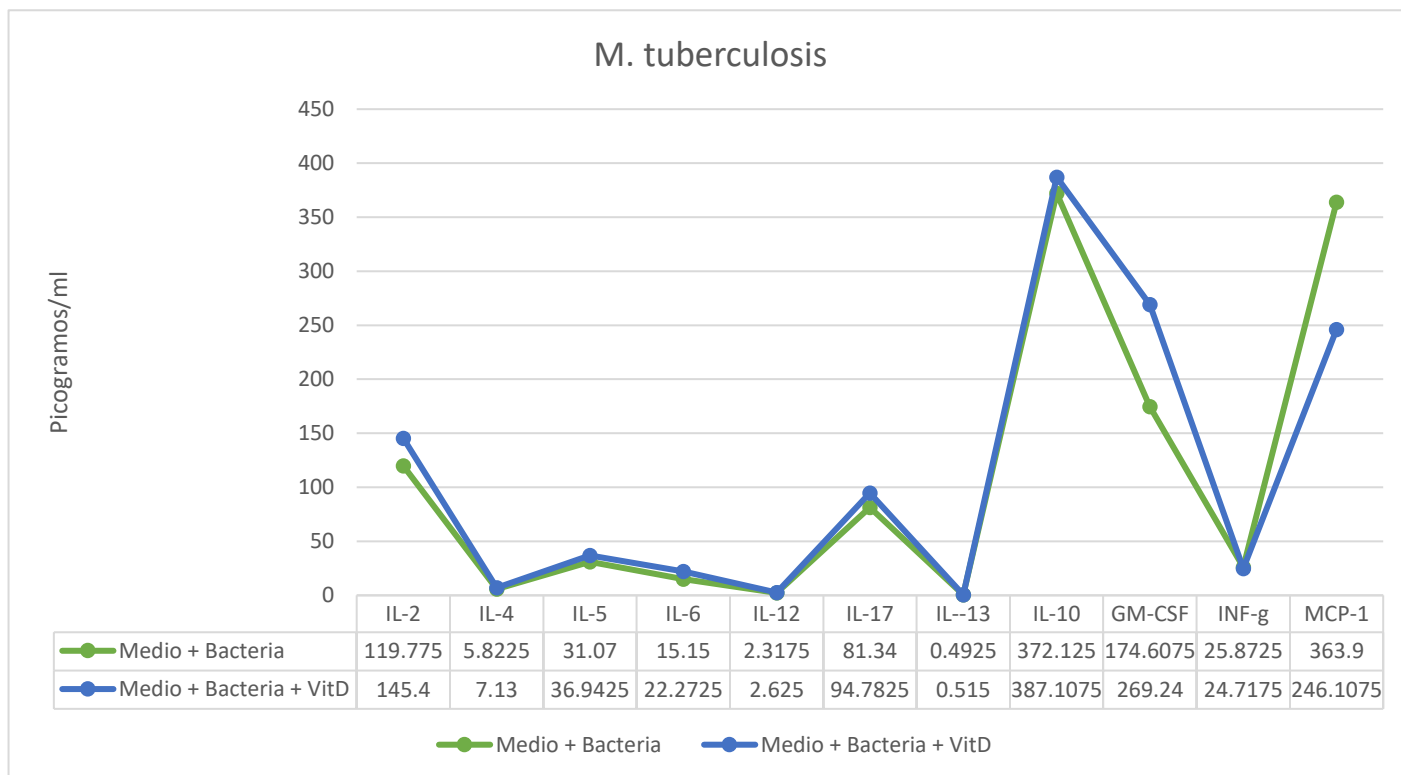


Figura 18. Efecto de la vitamina D en la cepa *M. tuberculosis*. Esta grafica no muestra la producción de citocinas que estaban fuera de rango. TNF- α , G-CSF- α e IL-1 β .

M. simiae presento menor actividad en cuanto a la producción de citocinas con la adición de vitamina D, comparada con otras micobacterias. (Figura 19 y 20).

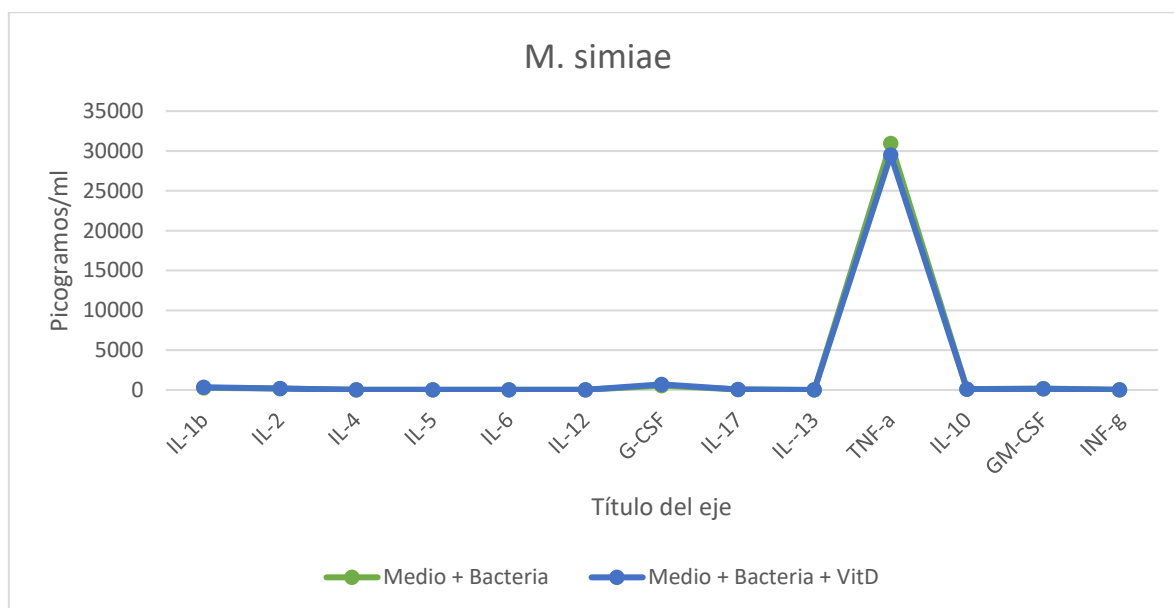


Figura 19. Efecto de la vitamina D sobre la producción de citocinas en células THP-1 infectadas con la cepa *M. simiae*. Donde se aprecia menor actividad en la producción de las citocinas al adicionar con vitamina D.

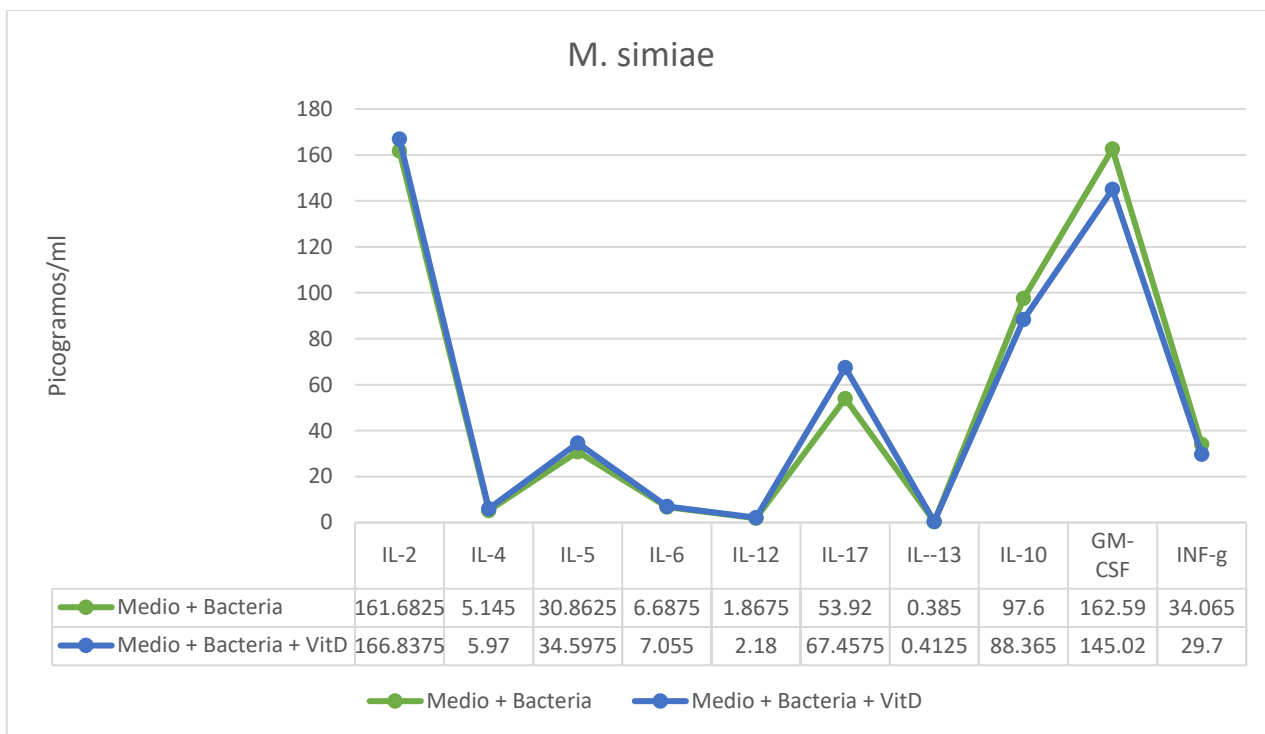


Figura 20. Efecto de la vitamina D en la cepa *M. simiae*. Esta grafica no muestra la producción de citocinas que estaban fuera de rango. TNF- α , G-CSF-a e IL-1 β .

En cuanto a las interleucinas IL-7, IL-8 y MIP-1 β no se cuantifico adecuadamente ya que los valores se encontraban muy por arriba y/o por debajo del intervalo de sensibilidad de la técnica.

10. DISCUSIÓN

La vitamina D juega un papel crucial en la regulación de numerosas respuestas fisiológicas y celulares, además de ser reconocido como uno de los primeros mediadores en la homeostasis ósea, actividad antimicrobiana por medio de la activación de la respuesta inmune innata con inducción de fagocitosis, disminución de metaloproteinasas y producción de péptidos antimicrobianos como catelicidina (LL-37), por lo que juegan un papel importante en el control de la infección por *Mtb* y MNT^{4, 5,19,20}. Motivo por el cual la vitamina D representa un rol importante contra de infecciones en el sistema respiratorio²⁹. La deficiencia de vitamina D se ha relacionado con predisposición para el desarrollo de disfunción de la respuesta inmune y desarrollo de infección por micobacterias del complejo *Mtb* y MNT^{27, 28, 30}.

La autofagia que es una vía de catabolismo mediado por lisosomas, con la formación de fagolisosoma, es un paso esencial para la eliminación de micobacterias además de considerarse un paso clave en la resistencia de las mismas^{4, 5}. La expresión de la fracción humana de β -defencina 4 (AMP's) requiere tanto de la activación de TLR2/1-mediado por IL-1 β , como VDR^{4, 5}. La autofagia representa el puente de unión entre la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa, es regulada a través de la actividad de citocinas producidas por células T. La citocinas Th1, consideradas citocinas proinflamatorias, entre ellas IFN- γ activa la autofagia en macrófagos para eliminar MTb; así mismo las citocinas Th2, citocinas antiinflamatorias, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 inhiben dicho proceso^{4, 5}.

Se ha observado una variedad en la producción de citocinas inflamatorias (Th1 y Th2) en respuesta a la infección por *Mtb* en células mononucleares de sangre periférica. Sin haberse estudiado la producción con otras micobacterias diferentes a *Mtb*. En el presente estudio se encontró diferencias en la producción de citocinas dependiendo de la cepa estudiada, presentando mayor variabilidad en la producción de: IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-17, TNF- α , G-CSF y GM-CSF. Lo que demuestra un comportamiento diferente en la producción de citocinas dependiendo de la cepa estudiada.

En cuanto a nuestra hipótesis inicial, sobre el efecto inmunoregulador de la vitamina D. Estudios observacionales publicados entre 1989 y el 2008, han encontrado una asociación entre los niveles bajos de vitamina D y el riesgo de progresión de tuberculosis, reportando que los niveles séricos bajos de vitamina D se asocian a un mayor riesgo de tuberculosis activa, sugiriendo un rol potencial de la suplementación con vitamina D en pacientes con tuberculosis activa e hipovitaminosis D. Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos de la eficacia de la suplementación de Vitamina D en el tratamiento de la tuberculosis son inconsistentes. Es por ello, que dentro de nuestra hipótesis surge el cuestionamiento si la función inmunoreguladora de la vitamina D en el tratamiento de la infección micobacteriana depende de la cepa micobacteriana involucrada en la infección. En nuestro estudio se demostró una mayor producción de citocinas en células THP-1

infectadas con micobacterias del complejo *Mtb*, adicionadas con vitamina D; comparadas con micobacterias no tuberculosas. Lo que nos indica que las inconsistencias antes descritas sobre el efecto de la vitamina D, pueden tratarse debido al tipo de micobacteria causante de la infección. Lo que pondría en duda el efecto de la vitamina D en infecciones por micobacterias diferentes al complejo *Mtb*, contrario a lo descrito anteriormente, donde encontraron niveles bajos de vitamina D en pacientes con infección por MNT²⁷.

Dentro del estudio de las diferentes citocinas producidas en infección por micobacterias:

El IFN- γ tiene función importante en la inmunidad adquirida contra micobacterias y otros agentes patógenos intracelulares, actúa como factor activador de macrófagos, siendo regulado por citocinas como IL-12 e IL-18^{37,38}. Sin embargo, en nuestro estudio no presento un incremento superior a otras citocinas. A diferencia de TNF- α que demostró un incremento importante y a diferentes niveles entre las diferentes cepas de micobacterias estudiadas. Así mismo no presento incremento en su producción al adicionar vitamina D.

TNF- α es una citocina esencial para la regulación de quimiocinas que controlan la formación y mantenimiento de los granulomas, además contribuye, junto con IL-12, a la activación de células asesinas naturales, es considerado como la principal mediador proinflamatorio^{37,38,39}. Lo antes descrito ha sido observado en infección por *Mtb*, sin embargo en nuestro estudio *M. simiae* presento mayor producción de dicha citocina comparado con *Mtb*. Sin embargo pese a lo antes descrito no presento ningún efecto en su producción al adicionar vitamina D, lo que nos hace dudar si existe realmente un efecto de la vitamina D en micobacterias diferentes al complejo *Mtb*.

IL-1 β es una citocina proinflamatoria mediada por activación de receptor TLR, MyD88 (componente esencial en la respuesta innata en infección por *Mtb*) y caspasa-1. Participa en la protección contra micobacterias, además de estar relacionada con el cuadro clínico presentado en infección por *Mtb* caracterizado por fiebre y pérdida de peso^{38,40}. En nuestro estudio se encontró elevación de dicha

citocina en todas las cepas estudiadas, con mayor producción en cepas del complejo Mtb (*Mtb* y *M. bovis*), comparadas con cepas MNT, lo que relaciona con descrito en la literatura. Además de un efecto positivo en su producción al adicionar vitamina D, tanto en infección por cepas del complejo Mtb como MNT.

IL-6 es una citocina producida ante un estímulo inflamatorio, se encuentra relacionada en procesos celulares como diferenciación, proliferación y apoptosis. Su producción puede estar inducida por otras citocinas incluyendo IL-1, TNF- α e IFN- γ , se han encontrado niveles disminuidos en pacientes con enfermedad cavitaria, indicando como marcador controlador en caso de enfermedad no cavitaria³⁸. En el presente estudio no se demostró una variabilidad importante en su producción comparando con las diferentes cepas estudiadas. Sin embargo, si presento un incremento en su producción al adicionar con vitamina D en cepas del complejo Mtb, contrario a lo observado en estudios previos³⁸, ya que en su mayoría estas infecciones estaban relacionadas con enfermedad cavitaria. Sin encontrar efecto en su producción al adicionar vitamina D en cepas de MNT.

En cuanto a la producción de IL-12 juega un papel importante entre la respuesta inmune innata y adaptativa, se ha observado que una disminución en su producción se relaciona con un incremento en predisposición de infección por Mtb, así mismo se ha visto que una producción estable y prolongada de IL-12 es necesaria para mantener la producción de IFN- γ ³⁸. En nuestro estudio no presento variabilidad en su producción con las diferentes cepas estudias. Sin embargo al adicionar vitamina D presento un incremento importante en su producción tanto en micobacterias del complejo *Mtb* como MNT.

IL-17 es una citocina proinflamatoria, cuya principal función es proteger contra patógenos invasivos³⁸. En nuestro estudio se observó una variabilidad en su producción dependiendo de la cepa estudiada, así mismo presento un incremento en su producción con la adición de vitamina D en micobacterias del complejo *Mtb* y MNT.

Las células mononucleares de pacientes con *Mtb* producen grandes cantidades de IL-10, siendo considerada como citocina antiinflamatoria o reguladora negativa de la actividad del sistema inmunitario. En el presente estudio no se evidencio un

incremento importante en su producción en células THP-1 infectadas por las diferentes cepas estudiadas. Al igual que el resto de interleucinas antiinflamatorias Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13. Se observó un incremento en la producción de IL-4 e IL-5 al adicionar vitamina D tanto en micobacterias del complejo *Mtb* como MNT.

Dentro de nuestros objetivos secundarios, se analizaron las características clínicas y radiológicas de las cepas incluidas en el estudio. Estudios previos indican que los factores de riesgo más importantes para adquirir infección por MNT son las alteraciones estructurales pulmonares como: EPOC, bronquiectasias, fibrosis quística, secuelas de tuberculosis, silicosis, neumoconiosis y proteinosis pulmonar. Otros factores relacionados son la edad, sexo masculino, tabaquismo, alcoholismo, exposición a minería y fundición³⁴. Dentro de la susceptibilidad adquirida se encuentran: infección por VIH, cáncer de órganos sólidos y hematológicos, también se ha observado en trasplantes de células hematopoyéticas con una incidencia de 0.4-4.9%, infectando pulmón en un 30% de los casos; además se ha observado infección por MNT en pacientes con diabetes sin ser un factor independiente para la infección. Así mismo en los últimos años se ha encontrado un aumento la infección por MNT en pacientes inmunocompetentes^{1,3,10}. En el presente estudio en las cepas incluidas de los factores principalmente analizados en el caso de MNT fue la desnutrición grave, la cual se presentó en pacientes con infección de *M. simiae*, y la infección por VIH que se encontraba en los pacientes con infección por *M. avium*. Esto podría correlacionarse con un nivel más bajo en cuanto a los niveles de vitamina D como se había descrito en estudio previos referente a infección por MNT²⁷.

En cuanto a las características radiológicas, las alteraciones pulmonares mayormente encontradas fueron la presencia de cavitaciones y bronquiectasias, tanto en infecciones por micobacterias del complejo *Mtb*, como MNT. Lo que se relaciona con lo descrito en la literatura^{1,2}.

11. CONCLUSIÓN:

La respuesta inmunológica celular tiene una función relevante en la resolución de infecciones por micobacterias. Los linfocitos CD4 endógenos-específicos son las células que intervienen de manera determinante en este proceso, ya que por medio del perfil de citocinas que producen, pueden desviar la respuesta inmunológica hacia la susceptibilidad o la resistencia a la enfermedad.

Existe una gran variabilidad en la respuesta en la producción de citocinas dependiendo de la cepa de micobacteria estudiada, lo que nos indica la gran variabilidad en la respuesta a la adición de vitamina D como inmunomodulador.

Se demostró una mayor producción de citocinas en células THP-1 infectadas con micobacterias del complejo Mtb, adicionadas con vitamina D; comparadas con micobacterias no tuberculosas. Lo nos hace dudar si realmente existen algún efecto inmunomodulador de la vitamina D en micobacterias diferentes al complejo Mtb.

En el presente estudio se demostró un incremento en la producción de citocinas de células THP-1 infectadas con diferentes cepas de micobacterias, observándose incremento tanto en citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias, como fue el caso de IL-4 e IL-5. Probablemente debido.....

Dentro de los objetivos secundarios se analizaron las características clínicas y radiológicas de las cepas incluidas en el estudio. Dentro de los factores más importantes para infección por MNT se identificaron la desnutrición grave, en caso de infección por *M. simiae* e infección por VIH en infección por *M. avium*. Lo que podría asociarse con niveles más bajos de vitamina D.

En cuanto a las características radiológicas, la presentación más habitual fue la presencia de cavitaciones y bronquiectasias, demostradas por tomografía, mismo que se encontraba ya descrito en la literatura.

LIMITACIONES:

Dentro de las principales limitaciones del estudio el número de cepas de MNT incluidas, no representativas de todas las MNT. Para demostrar si realmente existe o no un efecto en la producción de citocinas al adicionar vitamina D.

La medición de crecimiento in vitro de las diferentes cepas incluidas en el estudio para demostrar si existe un efecto en la inhibición en su crecimiento posterior al adicionar vitamina D. Además de no haber medido la producción de LL-37 (principal péptido antimicrobiano), con y sin efecto de vitamina D.

12. ANEXOS

Tipo de Micobacterias	Edad	Sexo	IMC	Ocupación	Tabaquismo	Diabetes	Etilismo	Drogas	Otros	Imagen
M. Avium	37 años	Masc.	25.6 kg/m2	Desempleado	No	No	No	No	VIH	Cavitaciones
	33 años	Masc.	19.2 kg/m2	Taquero	No	No	Si	Si	VIH	Vidrio deslustrado
M. Simiae	58 años	Masc.	21 kg/m2	Desempleado	No	No	No	No	No	Cavitaciones
	58 años	Masc.	21.9 kg/m2	Desempleado	No	No	No	No	No	Bronquiectasias
M. Bovis	20 años	Fem.	17.8 kg/m2	Ama de casa	No	No	No	Si	No	Micronódulo
	20 años	Fem.	17.8 kg/m2	Ama de casa	No	No	No	No	ANA +	Micronódulo / Árbol gemación
M. Tuberculosis	44 años	Fem.	31.8 kg/m2	Ama de casa	No	Si	No	No	Diabetes	Micronódulo / Cavitación
	68 años	Fem.	---	Ama de casa	No	No	No	No	No	Cavitación

Tabla 1. Características clínicas de cepas incluidas en el estudio.

	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-12	G-CSF	IL-17	IL--13	TNF- α	IL-10	GM-CSF	IFN- γ	MCP-1	IL-7	IL-8	MIP-1 β
M. H37Ra	-	+	=	+	+	+	=	-	-	+	-	=	+	=	-	NA	NA
Mtb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=	-	NA	NA	NA
M. Bovis	+	+	+	+	+	=	+	+	=	+	-	=	=	-	NA	NA	NA
M. Simiae	+	+	+	+	=	+	+	+	+	-	-	-	-	-	NA	NA	NA
M. Avium	+	=	+	+	=	+	+	+	+	=	=	=	-	-	NA	NA	NA

Tabla 2. Efecto de la adición de vitamina D sobre la producción de citocinas en diferentes cepas de micobacterias (“+” efecto positivo; “-” efecto negativo; “=” sin efecto).



Imagen 1. Tomografía de tórax, corte transversal, de paciente con infección por *M. bovis*. En la que se observan la presencia de áreas de aumento en la atenuación de tipo micro y macronodular bilateral.



Imagen 2. Radiografía de tórax de paciente con infección por *Mtb*. En la que se observa la presencia de caverna en lóbulo superior izquierdo.



Imagen 3. Tomografía de tórax, corte transversal, de paciente con infección por *M. simiae*. En la que se observa la presencia de cavitación en lóbulo inferior derecho.

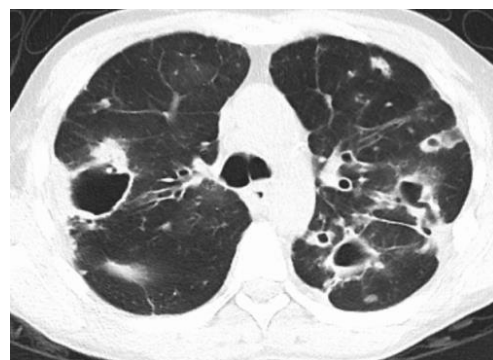


Imagen 4. Tomografía de tórax, corte transversal, de paciente con infección por *M. avium*. En la que se observa la presencia de múltiples cavitaciones distribuidas al azar.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stephen K. Field, MD, FCCP; Robert L. Cowie, MD, MSc; Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria; *Chest* 2006; 129; 1653-1672.
2. S-Y. Kim, B. Chang, B-H. Jeong, H. Y. Park, K. Jeon, S. J. Shin, W-J. Koh; Implication of vitamina D-associated factors in patients with non-tuberculous mycobacterial lung disease. *Int J Tuberc Lung Dis*; 2016; 20(12): 1594-1602.
3. Griffith D E, Aksamit T, Brown-Elliot B A, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, tretment, and prevention of non-tuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.
4. Hiroyuki Saiga, Yosuke Shimada and Kiyoshi Takeda; Innate Immune Effectors in Mycobacterial Infection; *Clinical and Developmental Immunology*, Volumen 2011.
5. Eun-Kyeong Jo; Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy; *Cellular Microbiology* (2010) 12(8), 1026-1035.
6. Yang, C.S., Shin, D.M., Lee Z.W., Lee C.H. et al. (2009); NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression. *J Immunol* 182: 3696-3705
7. Krutzik, S.R., Hewison, M., Liu, P.T., Robles, J.A., Stenger, S., Adams, J.S., et al. (2008) IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol* 181:7115-7120.
8. Lorenzo Guglielmetti, Faiza Mougari, Amanda López, Laurent Raskine, Emmanuelle Cambau; Human Infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious disease and clinical microbiology specialists´point of view. *Future Microbiol*
9. Registros bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
10. Guía de práctica clínica; Diagnóstico y tratamiento de las Infecciones por Micobacterias no Tuberculosas. México: Secretaría de Salud; 2014.
11. Campbell I, Drobniowski F, Novelli C, Ormerod P, Pozniak A. Manegement of opportunist mycobacterial infection: Joint Tuberculosis committe guidelines 1999. *Thorax*, 2000; 55:210-218.

12. Taiwo B, Glassroth J. Nontuberculous Mycobacterial Lung Diseases. *Infect Dis Clin N Am*, 2010; 24:769-789.
13. Cassidy M, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop K. Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology. *Clin Inf Dis*, 2009; 49(15):e124-129.
14. Marras T, Daley C. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med*, 2002; 23:553-567.
15. Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis*, 2008; 8:323-34.
16. Falkinham JO III. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 2002; 23:529-551.
17. Eric F. Egelund, PharmD, PhD, Kevin P. Fennelly, MD, MPH, Charles A. Peloquin, PharmD: Medications and Monitoring in Nontuberculous Mycobacteria Infections; *Clin Chest Med* 36 (2015), 55-66.
18. Morris HA. Vitamin D activities for health outcomes. *Ann Lab Med*. 2014; 34(3):181-6.
19. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients*. 2015;7(10):8251-60.
20. Sato, E., et al., Vitamin D-dependent cathelicidin inhibits *Mycobacterium marinum* infection in human monocytic cells. *J Dermatol Sci*. 70(3): p. 166-72.
21. Narang, N.K., R.C. Gupta, and M.K. Jain, Role of vitamin D in pulmonary tuberculosis. *J Assoc Physicians India*, 1984. 32(2): p. 185-8.
22. Wejse, C., et al., Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 179(9): p. 843-50.
23. Wang, Q., et al., Rationale and design of a randomized controlled trial of the effect of retinol and vitamin D supplementation on treatment in active pulmonary tuberculosis patients with diabetes. *BMC Infect Dis*, 2013. 13: p. 104.

24. Manca, C, Mycobacterium tuberculosis clinical isolate. 2001
25. Proc. Natl. Acad. Sci. Y Tsenova, L. Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis J.Infect. Dis. 2005.
26. Manca, C. Mycobacterium tuberculosis CDC1551. J. Immunol. 1999.
27. Kyeongman Jeon, Su-Young Kim, Byeong-Ho Jeong, Boksoon Chang, Sung Jae Shin, Won-Jung Koh; Severe vitamin D deficiency is associated with non-tuberculous mycobacterial lung disease: A case-control study; Respirology (2013); 18, 983-988.
28. María Teresa Herrera, Yolanda Gonzalez, Fernando Hernández-Sánchez, Guadalupe Fabián-San Miguel and Martha Torres; Low serum vitamin D levels in type 2 diabetes patients are associated with decreased mycobacterial activity. BMC Infectious Diseases (2017) 17:610.
29. Sif Hansdottir, MD, MS and Martha M. Monick, PhD; Vitamin D effects on lung immunity and respiratory diseases; Vitam Horm. 2011 ; 86: 217–237.
30. Bruno Rivas-Santiago, Rogelio Hernandez Pando, Claudia Carranza, et al. Expression of Cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epitelial Cells; Infection and Immunity, Mar. 2008, p. 935-941.
31. Shao-Jun Huang, Xian-Hua Wang, Zhi-Dong Liu, Wen-Li Cao, Yi Han, Ai-Guo Ma, Shao-Fa Xu; Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis; Drug Desing, Development and Therapy; 2017:11 91-102.
32. Robert S. Wallis and Alimuddin Zumla; Vitamin D as Adjunctive Host-Direct Therapy in Tuberculosis: A Systematic Review; Open Forum Infectious Diseases, IDSA.
33. S-Y. Kim, B. Chang, B-H. Jeong, H. Y. Park, K. Jeon, S. J. Shin, W-J. Koh; Implication of vitamina D-associated factors in patients with non-tuberculous mycobacterial lung disease. Int J Tuberc Lung Dis; 2016; 20(12): 1594-1602.
34. P. Sexton and A.C.Harrison; Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease; Eur Respir J 2008; 31: 1322-1333.

35. Thomson RM, Armstrong JG, Looke DF, Gastroesophageal reflux disease, acid suppression, and Mycobacterium Avium Complex pulmonary disease. Chest 2007; 131: 1166-1172.
36. Reljic R. IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. J Interferon Cytokine Res 2007;353-64.
37. Alma Yolanda Arce Mendoza, et al. Los extractos de Mycobacterium tuberculosis inducen la producción selectiva de citocinas inflamatorias y receptores de membrana. Medicina Universitaria 2008; 10(39): 79-86.
38. Racquel Domingo-Gonzalez, Oliver Prince, Andrea Cooper and Shabaana Khadre. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection. Microbiol Spectr. 2016 October; 4(5).
39. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, et al. TNF regulates chemokine induction for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. J Immunol 2002; 168:4620-7.
40. Wieland CW, Florquin S, Pater JM, Weijer S, van der Poll T. Interleukin-1 contributes to an effective clearance of Mycobacterium kansasii from the respiratory tract. Microbes Infect 2006;8:2409-13.

14. ABREVIATURAS:

INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
MNT	Micobacterias no tuberculosas
VIH	Síndrome de inmunodeficiencia humana
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
EUA	Estados Unidos de América
MAC	Complejo Mycobacterium avium
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa
ERGE	Enfermedad por reflujo gastro esofágico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN- γ	Interferon gamma

IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-beta
1,25(OH) $_2$ D	1,25-dihidroxy-vitamina D
CYP27B1	1- α -hidroxilasa
LL-37	Catelicidina
AMP's	Peptidos antimicrobianos
TLR's	Receptor Toll-like
THP-1	Human monocytic cell line
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elemento de respuesta a vitamina D
hCAP-18/LL-37	Proteína catiónica antimicrobial humana
NOX2	NADPH oxidasa