



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas



TÍTULO DEL TRABAJO

**Evaluación de la vía independiente de VDR para la inducción de LL-37 en la
infección con *Mycobacterium tuberculosis***

TESIS QUE PRESENTA

QFB Yolanda Monserrath Jacobo Delgado

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias Farmacobiológicas

Julio, 2021



Créditos Institucionales

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003383, a Nivel en Desarrollo. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 1009432. Esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social.



Evaluación de la vía independiente de VDR para la inducción de LL-37 en la infección con *Mycobacterium tuberculosis* by Yolanda Monserrath Jacobo Delgado is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License

TESIS QUE PRESENTA
QFB Yolanda Monserrath Jacobo Delgado

PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

JURADO

Dr. Bruno Rivas Santiago

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

San Luis Potosí, S.L.P.

Julio, 2021

**Comité Académico del
Posgrado En Ciencias
Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas /
UASLPPresente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría QFB. Yolanda Monserrath Jacobo Delgado, titulada “Evaluación de la vía independiente de VDR para la inducción de LL-37 en la infección con *Mycobacterium tuberculosis*”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día Jueves 22 de Julio del 2021 a las 13:30 hrs. en el Audiovisual de la Hemeroteca de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dr. Bruno Rivas Santiago

Director de Tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Co-Directora

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia

Asesora

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Asesor

Evaluación de la vía independiente de VDR para la inducción de LL-37 en la infección con *Mycobacterium tuberculosis*

Yolanda M. Jacobo-Delgado ^{1, 2}, Diana Patricia, Portales-Pérez ¹, Rosa del Carmen, Milán-Segovia ¹, Fidel, Martínez-Gutiérrez ¹, Bruno, Rivas-Santiago ²

1. Universidad Autónoma de San Luís Potosí, San Luís Potosí, SLP., México
2. Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Zacatecas, Zac., México

Resumen

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas. El principal mecanismo de defensa temprano frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es la respuesta inmune innata, destacando la secreción del péptido antimicrobiano LL-37 por macrófagos y células epiteliales. La vitamina D tiene un efecto positivo en el control de la TB al inducir a LL-37. El factor nuclear CEBP α induce a LL-37 por estrés al retículo endoplasmático. En este trabajo evaluamos el papel de CEBP α durante la infección con Mtb. Nuestros resultados indican que Mtb incrementa la expresión de CEBP α , el cual es necesario para la eliminación del bacilo. Nueva información sobre CEBP α durante la TB ayudará a proponerlo como blanco terapéutico al inducir o potenciar la respuesta inmune.

Palabras clave. Estrés a retículo endoplasmático, tuberculosis, péptidos antimicrobianos, CEBP α .

Índice

Contenido	Página
I. Introducción	7
II. Justificación	10
III. Hipótesis	10
IV. Objetivo general	10
V. Objetivos específicos	10
VI. Materiales y métodos	11
· Cultivo de células de epitelio respiratorio	11
· Cultivo de cepa bacteriana	11
· Infección de líneas celulares	12
· Tinción de Ziehl – Neelsen	12
· Diferenciación de macrófagos derivados de monocitos humanos	13
· Evaluación de células positivas a CD68	13
· Condiciones de cultivo celular	14
· Extracción del RNA total	14
· Síntesis y preparación de alícuotas de cDNA	15
· Evaluación de la expresión relativa por qRT-PCR	16
· Determinación de UFCs	17
· Análisis estadístico	17
VII. Resultados	18
· Determinación del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
· Internalización de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en células de epitelio pulmonar	19
· Expresión de CD68 en macrófagos derivados de monocitos humanos	20
· Expresión de CEBP α en células de epitelio pulmonar infectadas con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
· Expresión de CEBP α en hMDMs infectadas con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
· Efecto de la inhibición de estrés a RE y la vitamina D en el crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
VIII. Discusión	26
IX. Conclusión	31
X. Bibliografía	31

I. Introducción

La tuberculosis TB es una enfermedad infecciosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluye a linajes de micobacterias altamente relacionadas entre las que destaca *M. tuberculosis* (Mtb), *M. bovis* y *M. africanum* [1]. La TB se encuentra entre las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad y morbilidad a nivel mundial. En el año 2019 se reportaron 10 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes [2]. Por otro lado, en el Reporte Global de la TB del 2020 se destaca la creciente resistencia farmacológica, ya que en el año 2019 se reportó un incremento del 10% de casos de TB resistente a la rifampicina e isoniazida (TB multirresistente / MDR-TB) en comparación con el año anterior. A pesar de la Estrategia para poner fin a la TB planteada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2020, ésta sigue representando un riesgo latente. Además, la pandemia por COVID-19 ha dificultado los apoyos en el diagnóstico y tratamiento, por lo que se espera un rápido incremento de casos y muertes debidos a TB [2]. Esto evidencia la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para tratar la infección.

La infección por Mtb se presenta principalmente por la inhalación de aerosoles que contienen al bacilo y que son dispersados a través de tos, habla y estornudos por pacientes con TB activa. Cuando los bacilos ingresan a las vías respiratorias, el sistema inmune innato del huésped genera diversos mecanismos de protección. Se estima que alrededor del 70% de las personas expuestas al bacilo lo eliminarán de manera eficaz, es decir, solo el 30% se infectará y de éstos, solo el 10% llegará a desarrollar la enfermedad activa. El resto de los casos de TB logra contener al bacilo como resultado de la activación de la respuesta inmune [3]. Cuando los bacilos inhalados alcanzan el espacio alveolar, interactúan con células dendríticas (CD), células del epitelio pulmonar y macrófagos alveolares, siendo estos últimos su principal hospedero. Como parte de la respuesta inmune innata destaca la producción de citocinas y quimiocinas que inducen el reclutamiento de monocitos, fagocitos, linfocitos y CD al sitio de infección, además de sustancias bactericidas, como los péptidos antimicrobianos (AMPs) [4].

Los AMPs son moléculas efectoras del sistema inmune innato, éstas forman una

barrera soluble en diferentes epitelios mucosos, entre ellos en vías respiratorias, lo que impide la entrada de microorganismos potencialmente patógenos. Su acción antimicrobiana se fundamenta en la atracción electrostática entre el péptido y los componentes aniónicos de las membranas de los microorganismos patógenos, entre otros mecanismos [5]. LL-37 es la única catelicidina identificada en humanos, y es reconocida por su alta actividad inmunomoduladora y su amplio espectro microbicida [6]. LL-37 tiene la capacidad de lisar la pared celular micobacteriana [7] y su secreción por células del epitelio respiratorio y macrófagos alveolares constituye uno de los mecanismos más importantes durante la TB [4].

Estudios previos por nuestro grupo de investigación han demostrado que los macrófagos alveolares y neutrófilos infectados con Mtb producen altas concentraciones de LL-37 en las primeras 18 horas post infección, y que las concentraciones del péptido son dependientes de la multiplicidad de infección [8]. Por otra parte, se ha observado que el mismo péptido es capaz de modular la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias en macrófagos durante la infección con Mtb como posible mecanismo para lograr la resolución de la misma [9]. En otros estudios se han detectado altas concentraciones de CRAMP (homologo murino de LL-37) en células de epitelio pulmonar y macrófagos en un modelo de TB progresiva [10]. De manera complementaria, se han reportado altas concentraciones de LL-37 en pacientes de TB pulmonar activa [11-13]. Además, bajas concentraciones séricas del mismo péptido se asocian a una mayor susceptibilidad a la infección por Mtb [14]. En conjunto estos resultados sugieren que la catelicidina LL-37 participa en la eliminación de Mtb tanto en la respuesta inmune temprana como tardía.

LL-37 es secretado por una gran diversidad de células. Su precursor hCAP18 se expresa y almacena en gránulos de manera constitutiva, principalmente en células del sistema inmune [15-17], mientras que las células epiteliales lo expresan de manera inducible [8]. La liberación de LL-37 ocurre como consecuencia de la activación de TLRs o bien por alteraciones en el microambiente a causa de una infección o daño celular [18, 19]. Su expresión es regulada por la activación del gen CAMP, principalmente mediante la unión de la forma activa de la vitamina D (calcitriol) a su receptor (VDR), cuyos elementos de respuesta (VDRE) se

encuentran en la región promotora de CAMP [6]. Se ha reportado mayor susceptibilidad a desarrollar la infección activa en poblaciones con niveles séricos disminuidos de calcitriol y un peor pronóstico de la enfermedad [20, 21]. Aunado a esto se ha reportado que, en células de epitelio pulmonar, dentro del promotor de CAMP y adyacente a VDRE, se encuentra un sitio de unión al factor nuclear CEBP α , y se ha reportado que una activación conjunta entre CEBP α y VDR potencializa la producción de LL-37, así como la capacidad de CEBP α *per se* de inducir al mismo péptido [22].

CEBP α es el gen que codifica para la proteína del mismo nombre que pertenece a la familia de factores de transcripción C/EBP. Particularmente CEBP α reconoce al motivo CCAAT en los promotores de distintos genes diana, por tanto, se encuentra involucrado en la modulación de la expresión de diversos genes, principalmente durante la embriogénesis y la diferenciación celular [23]. Existen reportes donde CEBP α puede ser inducido en células de epitelio respiratorio por calcitriol y potenciar la transcripción de VDR en presencia y ausencia de la vitamina D [24]. Adicionalmente se ha reportado que al utilizar siRNAs para CEBP α se suprime la activación de CAMP [25]. Asimismo, el estrés al retículo endoplasmático (RE) en queratinocitos induce la expresión de CAMP mediante CEBP α de forma independiente a VDR [18]. A la fecha no hay reportes de que lo mismo ocurra durante la infección por TB.

II. Justificación

La TB es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas, y la aparición de cepas resistentes ha ido en aumento, por ende, representa un serio problema de salud pública. La principal respuesta temprana frente al bacilo Mtb es la respuesta inmune innata, dentro de la cual destaca la participación del AMP LL-37 en el control y resolución de la infección. Cuando el calcitriol, metabolito activo de la vitamina D, se une a su receptor VDR éste trasloca a núcleo y se une a los VDRE que, entre otras respuestas, induce la expresión de LL-37. Por otra parte, CEBP α es capaz de inducir al mismo péptido en condiciones de estrés al RE y, a la fecha se desconoce si genera el mismo efecto de inducción de LL-37 durante la infección por Mtb. Este estudio arrojará nueva información sobre CEBP α , que pudiera colocarlo como posible blanco terapéutico al inducir o potenciar la respuesta inmune innata.

III. Hipótesis

CEBP α promueve la expresión de LL-37 en la infección con Mtb, y su participación es necesaria para lograr un buen control de la misma en macrófagos derivados de monocitos (MDMs) y células de epitelio pulmonar.

IV. Objetivo general

Evaluar la capacidad del bacilo Mtb para inducir la expresión de CEBP α , así como la participación de CEBP α en el control de la infección en un modelo *in vitro*.

V. Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión génica del mRNA de CEBP α en hMDMs y células de epitelio pulmonar infectadas con Mtb y tratadas con inductor e inhibidor de estrés a RE.
2. Evaluar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por UFCs en hMDMs y células de epitelio pulmonar tratadas con vitamina D y un inhibidor farmacológico de estrés a RE.

VI. Materiales y métodos

Cultivo de células de epitelio respiratorio

Se utilizó una línea celular de epitelio respiratorio pertenecientes a neumocitos tipo II (A549, ATCC® CCL-185™). Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Nuaille, Francia) o 10% de FreeAdd 1X (FA) (Biowest, Nuaille, Francia), y 100 µg/mL de antibiótico penicilina-estreptomicina (Corning cellgro, Manassas, VA, USA), hasta alcanzar una confluencia del 90%. Para los ensayos de PCR se adhirieron 1.2×10^5 células por pozo en placas de 48 pozos (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) y para los ensayos de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) se adhirieron 5×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos (Corning cellgro, Manassas, VA, USA). Las células fueron adheridas con 500µL por pozo de medio de cultivo suplementado al 1% de SFB (Biowest, Nuaille, Francia) o 1% de FA (Biowest, Nuaille, Francia), y se incubaron 24 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Cultivo de cepa bacteriana

Todos los experimentos relacionados a Mtb se llevaron a cabo en un cuarto de contención de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, el cual cuenta con evidencia documental auditable de que: a) Las instalaciones se encuentran en estado satisfactorio de operación. b) El equipo se encuentra en estado satisfactorio de operación. c) Existen dispositivos personales de protección. La cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC® 27294™) se cultivó en frascos de poliestireno de 25cm² con 10mL de medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, USA) suplementado con 10% de ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa (OADC enrichment médium; BBL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 5% de Tween 80 y 0.2% de glicerol y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ en agitación. La cepa se mantuvo en cultivo hasta alcanzar la fase logarítmica, la cual se determinó mediante espectrofotometría midiendo la densidad óptica a 600nm. Previamente se reportó que una absorbancia de 0.762 corresponde a 1.33×10^8 bacterias/mL [26]. Posteriormente, la micobacteria se transfirió en tubos de

polipropileno de 50mL (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) y se centrifugó hasta obtener el pellet que fue resuspendido en medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, USA). Se realizaron alícuotas de trabajo con una concentración de 2×10^8 bacterias/mL, las cuales se almacenaron a -20°C .

Infección de líneas celulares

Las células con su respectivo tratamiento fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) 5:1 (bacterias: célula) durante 3 horas. Pasado el tiempo de infección se hicieron dos lavados con RPMI 1640 (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) para retirar las bacterias no internalizadas y se colocó nuevamente el tratamiento correspondiente hasta completar el tiempo de evaluación.

Tinción de Ziehl – Neelsen

Las células de epitelio respiratorio previamente adheridas en portaobjetos de cámara (Thermo Fisher Scientific) fueron infectadas con la cepa H37Rv (ATCC® 27294™), como se mencionó previamente. Posterior al tiempo de infección, los portaobjetos se lavaron con PBS 1X (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) para retirar los bacilos no internalizados. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 30 minutos. Se agregó el colorante fucsina fenicada (SEALAB, S.A. DE C.V.) y se pasó una flama por debajo de la laminilla durante 3 a 5 minutos, hasta lograr el desprendimiento de vapores. Inmediatamente las laminillas se lavaron con agua corriente alternando con baños de 1 segundo en alcohol-ácido (SEALAB, S.A. DE C.V.) hasta obtener un color rosa pálido. Para permitir la fijación del colorante de contraste, la laminilla fue sumergida en carbonato de litio (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) por 3 segundos. Luego la laminilla se sumergió en azul de metileno (SEALAB, S.A. DE C.V.), y se retiró el exceso con baños alternados de agua corriente y etanol al 96%. Finalmente se llevó a cabo la deshidratación de las laminillas y el montaje para su observación al microscopio.

Diferenciación de macrófagos derivados de monocitos humanos

Para la obtención de los macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDMs), se seleccionaron sujetos sanos del banco de sangre del Hospital General Zona No. 1, Dr. Emilio Varela Lujan, IMSS. El proyecto se encuentra aprobado por el Comité Nacional de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Comité Nacional de Investigación Científica bajo el número de registro R-2019-1912-075. Las células mononucleares (PBMC) fueron aisladas por gradiente de densidad a partir de sangre periférica utilizando Lymphopep (Stemcell Technologies, Vancouver, CA). Posteriormente los monocitos se purificaron por su capacidad de adherencia, para esto se colocaron 2.5×10^6 PBMC por pozo en placas de 24 pozos (Costar, Corning, NY, USA). Las células fueron incubadas durante dos horas a 37°C con 5% de CO_2 para permitir la adherencia de los monocitos. Pasado este tiempo se hizo un lavado con PBS 1X (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) para remover las células no adheridas. Las células adheridas fueron incubadas durante siete días más a 37°C con 5% de CO_2 para permitir su diferenciación a macrófagos en medio RPMI 1640 (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) suplementado al 10% con suero humano (SH) descomplementado o 10% de FreeAdd 1X (FA) (Biowest, Nuaille, Francia), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico penicilina-estreptomicina (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) y 2mM de L-glutamina (Corning cellgro, Manassas, VA, USA).

Evaluación de células positivas a CD68⁺

Después de siete días en cultivo se evaluó el marcador de diferenciación CD68⁺ en hMDMs por citometría de flujo. Los macrófagos fueron desprendidos de las placas con lavados de PBS 1X (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) por pipeteo. Posteriormente los macrófagos obtenidos se colocaron en tubos de poliestireno (Corning, Falcon, NY, USA) para llevar a cabo el marcaje. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con Cytifix / Cytoperm (BD Biosciences, USA) durante 20 minutos. Para el marcaje se agregó el anticuerpo anti-CD68-PE (BD Biosciences, USA) y se incubó por 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. Pasado el tiempo de incubación las células fueron lavadas dos veces con FACSFlo (BD Biosciences, USA) y resuspendidas en paraformaldehído al 4% para analizar 10,000 eventos en

el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin lakes, USA) mediante el software FACSDiva (Versión 6.1.3).

Condiciones de cultivo celular

Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento por duplicado y se compararon las células cultivadas y adheridas con FreeAdd 1X (FA) (Biowest, Nuaille, Francia) o suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Nuaille, Francia) en el caso de las células epiteliales, y suero humano (SH) en el caso de los hMDMs. Las condiciones a evaluar fueron; 1) Control sin infección 2) Inducción farmacológica de estrés al retículo endoplasmático (RE): el tratamiento con tunicamicina 200nM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) o tapsigargina 100nM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) fue por 6 horas. Ambos fármacos fueron resuspendidos utilizando etanol absoluto grado Biología molecular (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) como vehículo. Posteriormente se retiró el sobrenadante y las células se cultivaron en su respectivo medio por 18 horas más. 3) Infección con Mtb. 4) Infección con Mtb + calcitriol: el tratamiento con calcitriol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en las concentraciones $1 \times 10^{-8} \text{M}$ y $1 \times 10^{-6} \text{M}$ fue por 18 horas, iniciando al tiempo de la infección. 5) Infección con Mtb + calcitriol + ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) 200 μM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA): el tratamiento con el inhibidor de estrés de RE TUDCA fue por 6 horas previo a la infección.

Extracción del RNA total

Una vez que se completó el tiempo de cada tratamiento se retiró el sobrenadante y se colocó 200 μL /pozo de trizol (Invitrogen, Auckland Nueva Zelanda). Se dejó reposar 5 minutos y los lisados se recolectaron en tubos cónicos de 1.5mL (AxygenScientific, Union, CA, USA) y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Los tubos se homogenizaron en vórtex y se mantuvieron por 5 minutos a temperatura ambiente. La extracción de RNA total se realizó por el método de Cloroformo: Alcohol isoamílico, el cual consistió en agregar a cada tubo 40 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); posteriormente se homogenizaron y se centrifugaron 20 minutos a 13,000 rpm a

4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió 50µL de isopropanol frío (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Se dejó precipitar a -70°C por una hora. Posterior a esto, las muestras se centrifugaron por 16 minutos a 13,000 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregó 200µL de etanol frío al 75% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Inmediatamente las muestras se centrifugaron 16 minutos a 13,000 rpm a 4°C y nuevamente se retiró el sobrenadante. Las muestras se colocaron en el Speed Vac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, USA) por 15 minutos a una velocidad media de drenado. Finalmente, el RNA obtenido se resuspendió en 11µL de agua dietilpicrocarbonato (DEPC) para continuar con la síntesis de cDNA.

Síntesis y preparación de alícuotas de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó en el termociclador Applied-Biosystems siguiendo las especificaciones de la enzima que se utilizó. Para esto, en tubos cónicos de 200µL (AxygenScientific, Union, CA, USA) se agregó 0.5µL de Oligo-dT (ThermoFisher Scientific, Lithuania, EU) y los 11µL del RNA previamente extraído y resuspendido en agua DEPC. Las muestras se colocaron en el termociclador y se incubaron un ciclo de 10 minutos a 72°C seguido de 5 min a 4°C, tiempo en el que se añadió 6 µL/muestra de la siguiente mezcla de reacción; buffer 5x (Thermo Fisher Scientific, Lithuania, EU) 4 µL/reacción, dNTPs 10mM (Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) 1 µL/reacción y DTT 0.1M (Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) 2 µL/reacción. Las muestras se homogenizaron e incubaron en el termociclador un ciclo a 25°C por 5 minutos, seguido de otro ciclo a 4°C donde se agregó 0.5 uL/muestra de la enzima transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific, Lithuania, EU). Después de esto las muestras se incubaron un ciclo a 42°C por 50 minutos y un ciclo de 70°C durante 15 minutos. El cDNA se cuantificó en el NanoDrop® ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc, USA). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 260nm para determinar la concentración en ng/µL. Además, se utilizó la relación 260/280 nm y 260/230 nm para verificar la pureza que se obtuvo. A partir de las concentraciones de cada muestra, se realizaron alícuotas de trabajo de 80µL a una concentración de 75 ng/µL, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Evaluación de la expresión relativa por qRT-PCR

Para realizar la amplificación del gen de *CBP α* se utilizó un intercalante de cDNA EvaGreen (Biotium, California, E.U) y primers específicos, mostrados en la tabla 1, que fueron diseñados en Universal Probe-Library Assay Design Center de Roche. La mezcla de reacción para las amplificaciones se preparó de la siguiente manera: agua de PCR 2.5 μ L/reacción, primer reverse y forward 0.25 μ L/reacción de cada uno, Ssofast Eva Green 5 μ L/reacción. La amplificación del cDNA de cada muestra se realizó por duplicado en placas de 96 pozos (Roche LifeScience, USA), se colocaron 8 μ L de la mezcla de reacción y 2 μ L de cDNA por pozo, quedando a una concentración final de 150 ng/ μ L, a excepción del control negativo donde se colocó 2 μ L de agua de PCR en sustitución de la muestra. Una vez que las placas fueron cargadas, éstas fueron selladas y centrifugadas a 1200 rpm por 2 minutos. Las placas se colocaron en el termociclador Lightcycler® 480 (Roche Life Science, USA). El análisis de las curvas de amplificación para la determinación de los puntos de cruzamiento se llevó a cabo en el software Lightcycler 4.05 (Roche Applied Science) del mismo termociclador. Finalmente se realizó la normalización de los datos obtenidos de tres experimentos independientes por duplicado con base al gen constitutivo *HPRT*. Posteriormente en una plantilla en Microsoft Excel se determinó la expresión relativa a través del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [27], seguido de su análisis estadístico correspondiente.

Gen	Proteína	Primer reverse	Primer forward
HPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa	5' – ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC – 3'	5' – GAC CGG TTC TGT CAT GTC G – 3'
CEBP α	Proteína alfa de unión al potenciador CCAAT	5' – GTC TGG GTC CCC ATC CAT – 3'	5' – TCG GAT GCT AAC CTC TAC CG -3'

Tabla 1. Primers utilizados para evaluar la expresión del gen constitutivo *HPRT* y el gen de interés *CEBP α* . En la tabla se indica la proteína a la cual codifica cada gen, así como la secuencia de los primers reverse y forward.

Determinación de UFCs

Al finalizar los tiempos de tratamiento de las células infectadas, se eliminaron los sobrenadantes y se lisaron con SDS (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 10 minutos, posteriormente se neutralizó su acción con medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, USA) al 20% de BSA (Sigma-Aldrich, Alemania). De las bacterias que se obtuvieron de la lisis celular, se hicieron 4 diluciones seriadas (1:10) de cada pozo por triplicado. Para las diluciones se tomaron 30uL de la mezcla y se diluyeron en 270uL de medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, USA) en placas de 96 pozos (Corning cellgro, Manassas, VA, USA). Enseguida se tomaron 10μL de cada dilución y se sembraron por triplicado en cajas de Petri (Corning cellgro, Manassas, VA, USA) preparadas con agar Middlebrook 7H10 (DIFCO, USA). Finalmente, se incubaron durante 21 días a 37°C. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se contaron y se promediaron el número de colonias formadas en cada condición. Los resultados se compararon entre grupos para determinar si existía variación en el crecimiento de la micobacteria entre los diferentes tratamientos, y se hizo el análisis correspondiente.

Análisis estadístico

Los resultados muestran al menos tres experimentos independientes por duplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo en el software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA). De manera inicial se determinó si los datos eran paramétricos o no paramétricos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov; posteriormente para datos paramétricos se realizó un ANOVA con un post-test de Tukey y en el caso de datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con un post-test de Dunn. Se consideró para todos los análisis un valor estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

VII. Resultados

Determinación del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*

El crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fue monitoreado por densidad óptica cada 48 horas. Una vez que las células alcanzaron su fase logarítmica, marcada con una flecha roja, como se observa en la figura 1A, se continuó con la realización de las alícuotas de trabajo. El cultivo bacteriano fue verificado con la tinción de Ziehl Neelsen, como se observa en la figura 1B.

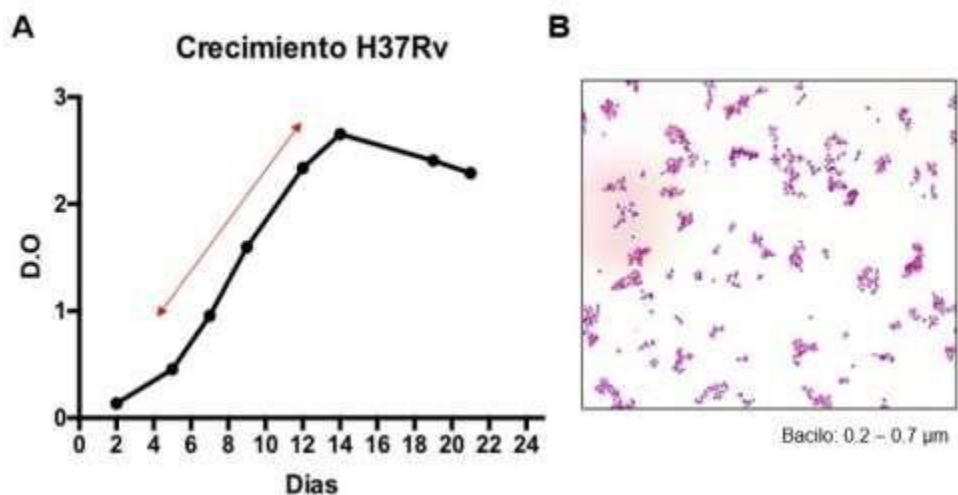


Figura 1. Curva de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. La cepa de Mtb H37Rv fue cultivada alrededor de 24 días para determinar la fase logarítmica de crecimiento, marcada con una flecha roja (A). El cultivo de Mtb fue verificado con la tinción para bacterias ácido alcohol resistentes Ziehl Neelsen (B).

Internalización de *Mycobacterium tuberculosis* en células de epitelio pulmonar

El suero fetal bovino (SFB) es el suplemento más comúnmente utilizado en cultivo celular, se compone por una gran variedad de factores de crecimiento, entre ellos vitaminas [28, 29]. Para descartar particularmente a la vitamina D, las células fueron cultivadas con FreeAdd 1X (FA), un sustituto del SFB ideal para cultivo celular [30]. El crecimiento fue monitoreado y comparado con células cultivadas en medio suplementado con SFB. Como se muestra en la figura 2A, no se observan diferencias morfológicas evidentes entre las células crecidas en ambas condiciones. Posteriormente se comparó la capacidad de internalización de Mtb y, como se muestra en la figura 2B y C, no hubo diferencias significativas en el índice y porcentaje de internalización de las células cultivadas con y sin SFB. Con base en lo anterior se descarta que las diferencias observadas en los siguientes experimentos sean debido a una menor capacidad de internalización de Mtb en células cultivadas con FA.

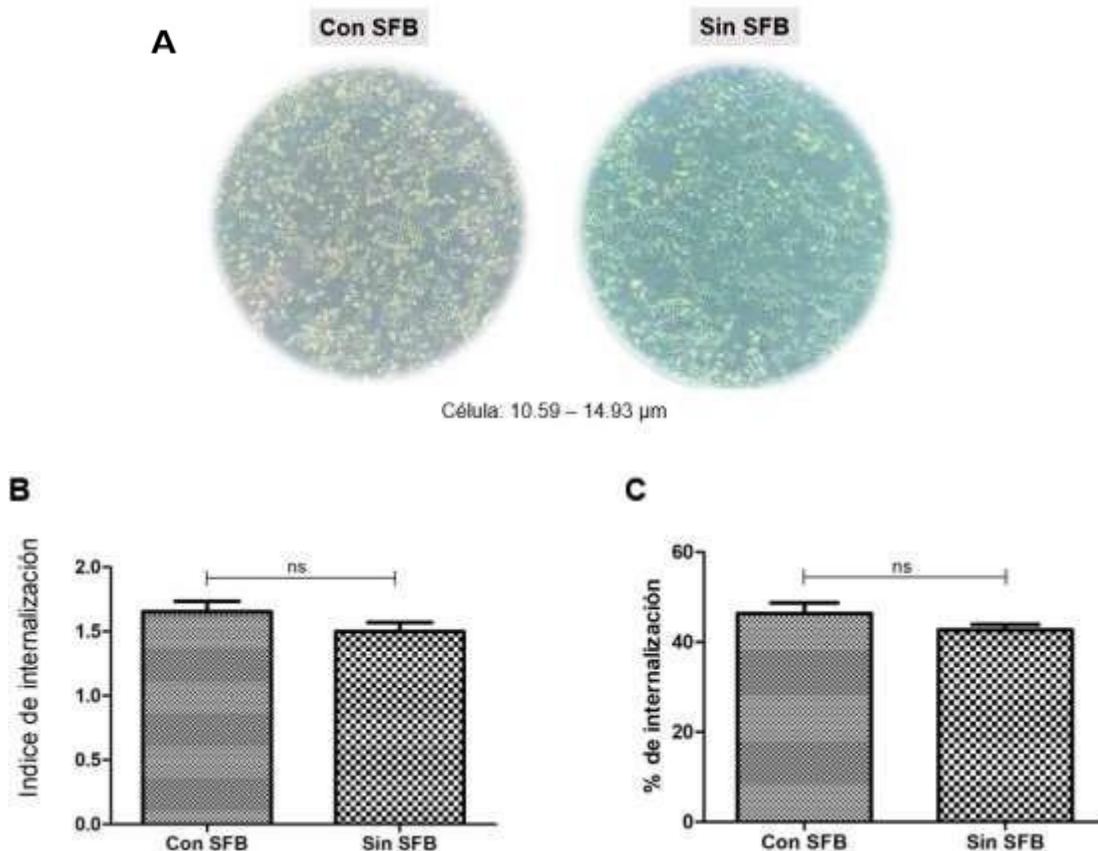
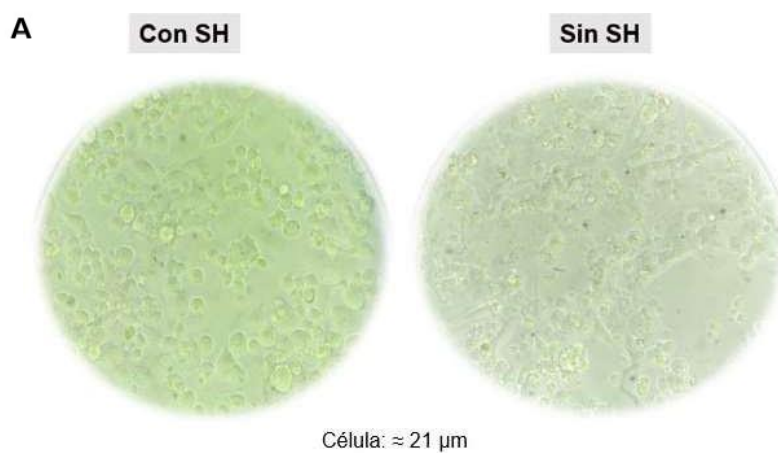


Figura 2. Las células de epitelio pulmonar cultivadas sin SFB no muestran alteraciones en la morfología ni en la capacidad de internalización de *Mycobacterium tuberculosis* Las células de epitelio pulmonar fueron cultivadas en medio suplementado con SFB o FA y se monitoreo su crecimiento. Se muestran fotos representativas tomadas a las 48 horas de cultivo con un microscopio invertido (Leica Microsystems, Alemania) en el objetivo de 40x (A). Posteriormente, las células fueron adheridas e infectadas con Mtb. La internalización fue determinada mediante la tinción de Ziehl – Neelsen. Se muestra el índice (B) y porcentaje (C) de internalización de tres experimentos independientes por duplicado indicando la media \pm DE.

Expresión de CD68 en macrófagos derivados de monocitos humanos

Los hMDMs, a diferencia de las células de epitelio pulmonar, son cultivados y diferenciados en medio suplementado con suero humano (SH). Nuevamente, para descartar la vitamina D intrínseca del suero, los hMDMs fueron cultivados en medio suplementado con FA. El crecimiento fue monitoreado y comparado con células cultivadas en medio suplementado con SH. Como se observa en la figura 3A, parece haber diferencias morfológicas entre las células cultivadas en ambas condiciones. Por ello se comparó el porcentaje de expresión de CD68, marcador altamente expresado en macrófagos diferenciados. Como se muestra en la figura 3B, no hubo diferencias significativas en la expresión del marcador entre las células cultivadas con y sin SH, por lo que se descarta que las diferencias observadas en los siguientes experimentos sean debido a un menor grado de diferenciación en células cultivadas con FA.



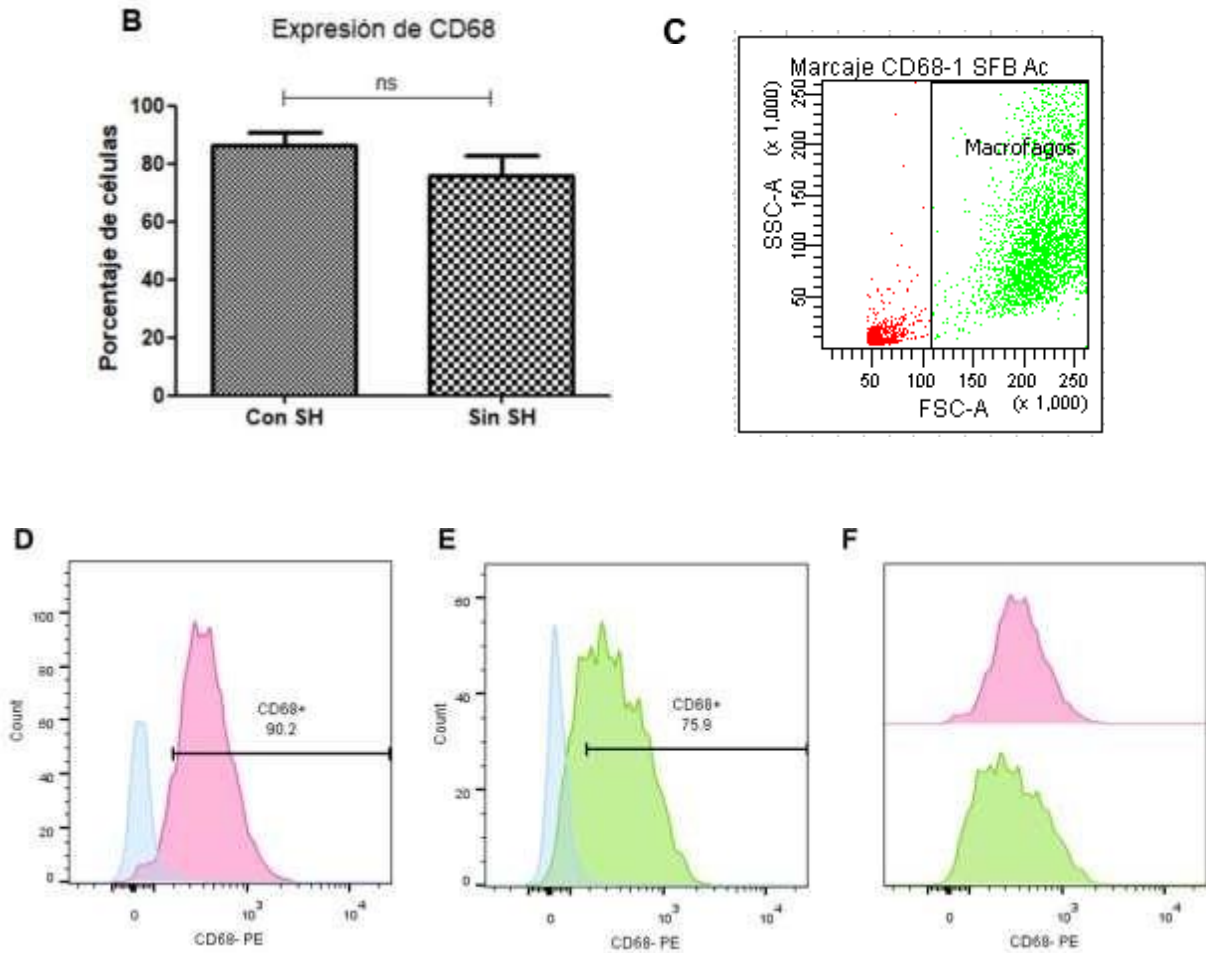


Figura 3. El cultivo de hMDMs sin SH no afecta la expresión de CD68 Los monocitos fueron obtenidos de sangre periférica y diferenciados a macrófagos por adherencia durante siete días en medio suplementado con SH o FA y se monitoreo el grado de diferenciación. Se muestran fotos representativas tomadas a los 7 días de incubación con un microscopio invertido (Leica Microsystems, Alemania) en el objetivo de 40x (A). Posteriormente se evaluó la expresión de CD68 por citometría de flujo (B). Se muestra el porcentaje de expresión de CD68 de tres experimentos independientes por duplicado indicando la media \pm DE. Se muestra la población seleccionada para la evaluación de CD68 (C) y gráficas representativas de la señal del control de isotipo (azul) y la expresión de CD68 (rosa / verde) para células diferenciadas con SH (D) y FA (E), así como un histograma de comparación entre ambas condiciones (F).

Expresión de CEBP α en células de epitelio pulmonar infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*

Se comparó la inducción de la expresión del factor nuclear CEBP α entre células cultivadas con y sin SFB (Figura 4A y B, respectivamente). Los resultados muestran un mismo patrón de expresión entre ambas condiciones: la expresión de CEBP α se vio significativamente incrementada en los tratamientos con los controles positivos de inducción de estrés a retículo endoplasmático (RE) tapsigargina y tunicamicina (Tg y Tm, respectivamente). Así mismo se observó una disminución significativa de la expresión del mismo gen cuando se agregó el inhibidor farmacológico de estrés a RE, TUDCA, confirmando la funcionalidad de los controles. Se observó un incremento en la expresión de CEBP α considerablemente mayor en células infectadas con Mtb, mismo que se vio drásticamente disminuido cuando las células fueron tratadas con el inhibidor TUDCA antes de la infección, lo que confirma que la inducción de CEBP α es mediante el estrés a RE ocasionado por la micobacteria. En estas células se evaluaron dos concentraciones de Tm y TUDCA, para ambas moléculas se decidió trabajar con la concentración más alta, 200nM y 200mM respectivamente, ya que fue en estas concentraciones en donde el efecto fue más evidente. Aparentemente en las células cultivadas con SFB el efecto se ve potencializado en comparación cuando éste fue sustituido por FA, sin embargo, como se observa en la figura 4C, la diferencia entre ambas condiciones no fue significativa para ninguno de los tratamientos evaluados.

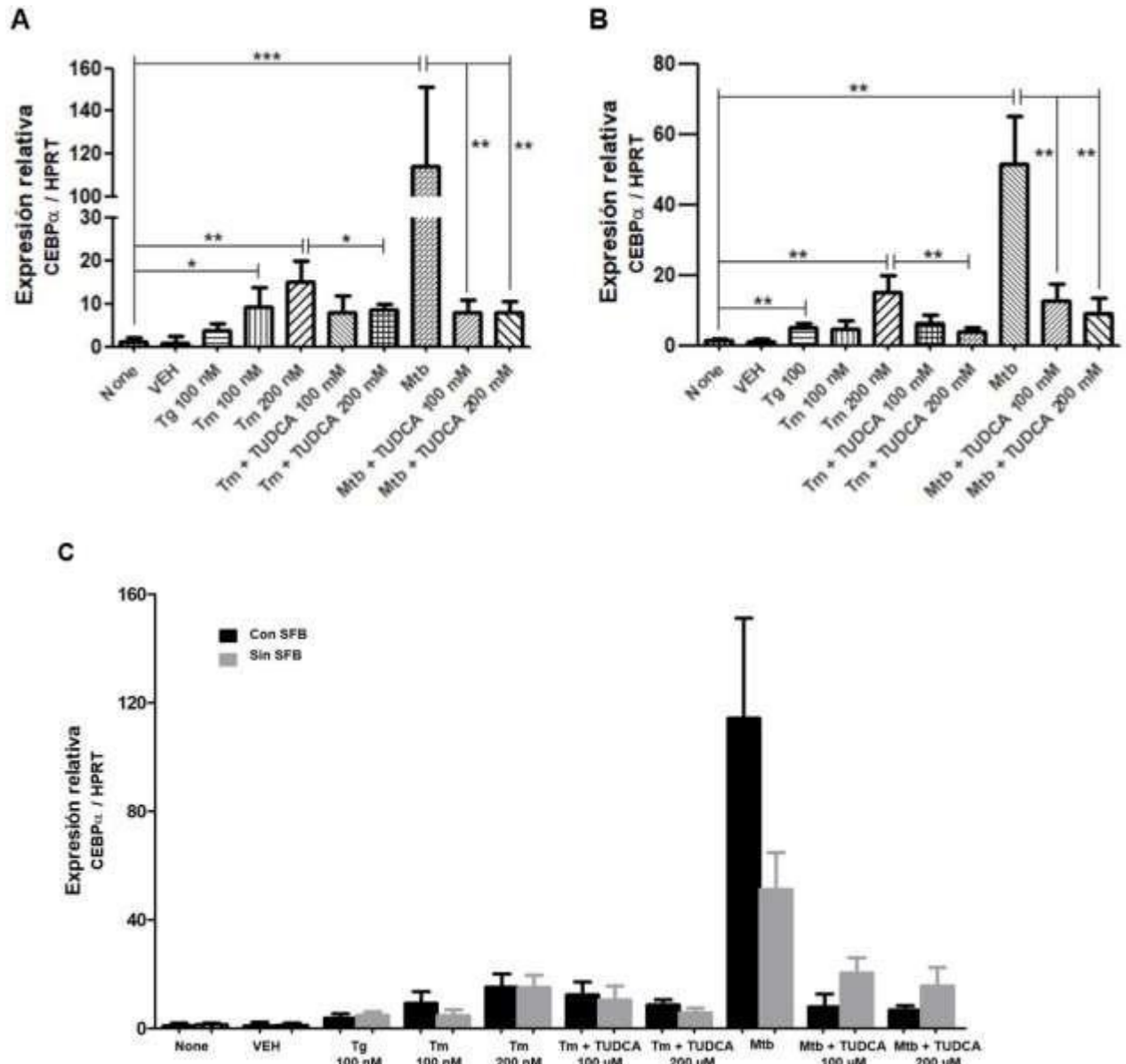


Figura 4. La inducción de CEBPα en células epiteliales de pulmón sigue el mismo patrón de expresión entre células cultivadas con y sin SFB Las células de epitelio pulmonar fueron cultivadas y adheridas en medio suplementado con SFB o FA, (A y B, respectivamente), y fueron estimuladas con los diferentes tratamientos, como se muestra en las gráficas. Se comparó la inducción de la expresión de CEBPα por parte de los distintos tratamientos entre las condiciones con y sin SFB (C). Inductores de estrés a RE: Tapsigargina y Tunicamicina (Tg y Tm, respectivamente). Inhibidor de estrés a RE: Ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA). Vehículo (VEH): etanol absoluto grado biología molecular. Se muestra la expresión relativa de CEBPα respecto al gen constitutivo HPRT de tres experimentos independientes por duplicado, indicando la media ± DE. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$

Expresión de CEBP α en hMDMs infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*

Los hMDMs, a diferencia de las células de epitelio pulmonar, son cultivados y diferenciados en medio suplementado con suero humano (SH). Por lo tanto, se comparó la inducción de la expresión del factor CEBP α entre células cultivadas con y sin SH (Figura 5A y 5B, respectivamente). Solo se evaluó la concentración de Tm y TUDCA donde el efecto fue más evidente en células epiteliales de pulmón. Como se aprecia en la figura 5C, el efecto de inducción de CEBP α observado entre ambas condiciones, fue similar para los controles de inducción e inhibición de estrés a RE. En contraste, hubo un efecto diferencial en las células infectadas con Mtb, ya que no se apreció una inducción de CEBP α significativa en las células cultivadas con SH, pero sí en aquellas donde el SH fue reemplazado por FA.

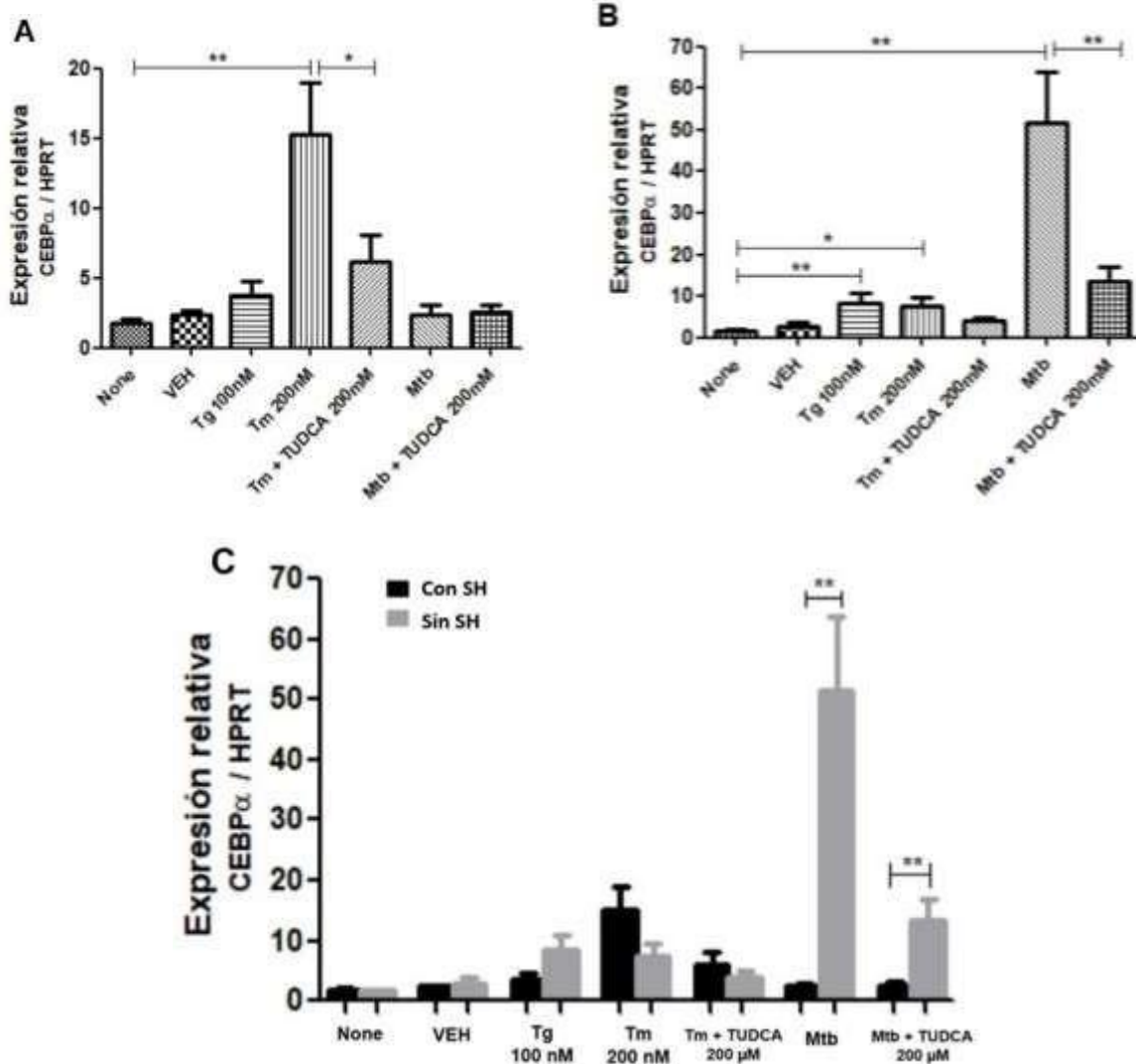


Figura 5. La inducción de CEBP α en hMDMs fue diferente en células infectadas con Mtb cultivadas con y sin SH Los monocitos fueron obtenidos a partir de sangre periférica y diferenciados a macrófagos por adherencia durante siete días en medio suplementado con SH o FA (A y B, respectivamente) y fueron estimulados con los diferentes tratamientos, como se muestra en las gráficas. Posteriormente se comparó la inducción de la expresión de CEBP α entre las condiciones con y sin SH (C). Inductores de estrés a RE: Tapsigargina y Tunicamicina (Tg y Tm, respectivamente). Inhibidor de estrés a RE: Ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA). Vehículo (VEH): etanol absoluto grado biología molecular. Se muestra la expresión relativa de CEBP α respecto al gen constitutivo HPRT de tres experimentos independientes por duplicado, indicando la media \pm DE. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$

Efecto de la inhibición de estrés a RE y la vitamina D en el crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*

Las células de epitelio pulmonar y los hMDMs (Figura 6A y B, respectivamente) fueron cultivados en medio suplementado con FA. Posteriormente fueron estimulados con dos concentraciones de vitamina D en presencia o ausencia de un pre-estimulo con el inhibidor de estrés a RE TUDCA, y se evaluó el crecimiento intracelular de Mtb mediante CFUs. Como se esperaba, ambas concentraciones de vitamina D disminuyeron significativamente las cuentas de CFUs en ambos tipos celulares. Cuando se llevó a cabo el pre-estimulo con el inhibidor de estrés a RE TUDCA, se observó un mayor crecimiento de Mtb, que fue más evidente en los hMDMs, lo que sugiere que el estrés a RE es un mecanismo celular para contener el crecimiento intracelular de Mtb.

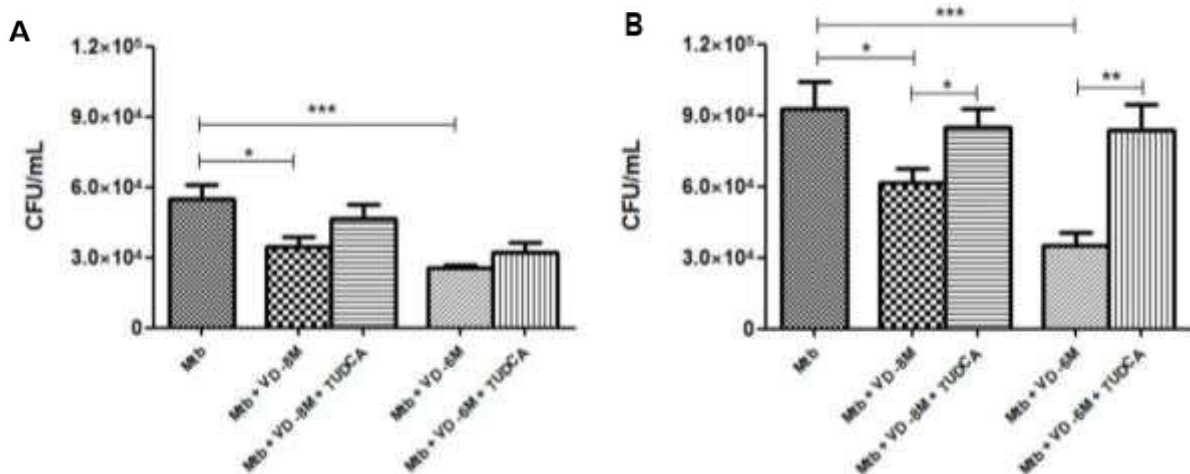


Figura 6. La inhibición del estrés a RE favorece el crecimiento intracelular de Mtb Las células de epitelio pulmonar y los hMDMs (A y B, correspondientemente) fueron cultivados en medio suplementado con FA. Posteriormente las células fueron infectadas con Mtb y tratadas con vitamina D (VD) en presencia o ausencia del inhibidor de estrés a RE TUDCA. El crecimiento intracelular de Mtb fue evaluado por ensayos de CFUs. Se muestra el crecimiento intracelular de tres experimentos independientes por duplicado, indicando la media \pm DE. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$

VIII. Discusión

A pesar de las estrategias implementadas, la TB sigue representando un gran problema de salud pública [2], por lo tanto, es evidente la creciente necesidad de desarrollar nuevas técnicas para combatir la infección. Sin embargo, es necesario continuar con estudios que permitan dilucidar los mecanismos involucrados durante la infección por Mtb.

Entre las primeras líneas de defensa por parte de las células epiteliales y macrófagos alveolares frente a Mtb destaca la secreción de moléculas bactericidas, siendo la catelicidina LL-37 una molécula clave por su capacidad de lisar la pared micobacteriana [4, 7]. Complementario a esto, se han asociado altas concentraciones séricas de LL-37 a una mayor capacidad de eliminación del bacilo en pacientes con TB activa [13]. Por otra parte, como ya se mencionó, previamente se ha reconocido la importancia de la vitamina D en la inducción de la expresión del mismo péptido [6]. Esto concuerda con estudios donde altas concentraciones séricas de vitamina D se asocian a un mejor pronóstico en la infección por TB [20]. En este sentido, la identificación del sitio de unión a CEBP α adyacente a los elementos de respuesta a vitamina D (VDRE) en el promotor de CAMP [22] y su capacidad de inducir la expresión de LL-37 de manera independiente a la vitamina D [31] sugieren una participación importante del factor nuclear en la respuesta frente a Mtb. Además, mediante estudios computacionales, se han reportado predicciones donde polimorfismos de un solo nucleótido en el gen que codifica para CEBP α altera el perfil transcripcional de LL-37 [32].

Lo primero que observamos fue que la infección por Mtb induce significativamente la expresión de CEBP α , lo que sugiere la activación de este gen como parte de la respuesta frente a la micobacteria, y hasta ahora no se había reportado la capacidad del bacilo de inducir la expresión de este factor nuclear. CEBP α pertenece a una familia de factores de transcripción que se expresa en una gran variedad de tejidos, particularmente se han encontrado sitios de unión en genes asociados a la respuesta inflamatoria y que se ven activados tras estímulos con lipopolisacárido, sugiriendo su papel en la modulación de la respuesta inmune innata, aunque en este sentido ha destacado más la participación de CEBP β y CEBP γ [33]. Además, se ha descrito la capacidad de CEBP α de interactuar físicamente con NF- κ B, y la activación conjunta de ambos factores de transcripción resulta en un sinergismo sobre los genes blanco de NF- κ B [34]. NF- κ B ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de activar la respuesta inmune e inducir la expresión de AMPs [35], por lo que la interacción entre ambos factores de transcripción sugiere una participación en la modulación inmune innata por parte de CEBP α . Pese a esta información, poco se ha reportado sobre su participación en la respuesta a infecciones. CEBP α es capaz de modular la expresión de microRNAs reguladores clave de la respuesta inflamatoria en neutrófilos infectados con *S. aureus*, y cuya expresión se ha asociado a una mayor capacidad bactericida de los neutrófilos, promoviendo la eliminación bacteriana [36]. Por otro lado se ha reportado que uno de los mecanismos de patogenicidad del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 es suprimir la activación de CEBP α [37]. Otros estudios han descrito detalladamente que estímulos infecciosos pueden inducir estrés al RE mediante la activación de TLRs, y uno de los factores de transcripción involucrados es CEBP α [38].

Previamente se ha reportado que el antígeno ESAT-6 secretado por la micobacteria promueve un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio [39], lo que a su vez afecta el plegamiento de las proteínas en el RE y activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) al inducir estrés al RE [40]. Así mismo, la inducción de estrés a RE es un mecanismo de defensa crucial en la respuesta contra Mtb en macrófagos infectados, ya que promueve la apoptosis y la

formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para controlar el crecimiento intracelular del bacilo [41, 42]. Sin embargo, se ha generado escasa información referente a los mecanismos involucrados, por lo que la activación de CEBP α durante la infección por Mtb como consecuencia de la inducción de estrés a RE, abre un camino de nuevas alternativas para estimular al sistema inmune, ya que la inducción de la activación directa del factor nuclear CEBP α podría incrementar la activación de NF- κ B y con ello la expresión de AMPs

En este estudio también observamos que células infectadas con Mtb y estimuladas con vitamina D, como se esperaba, tuvieron mayor capacidad de eliminación de la micobacteria en comparación con células que solo fueron infectadas. De manera interesante, este efecto se vio significativamente disminuido cuando se agregó el inhibidor farmacológico de estrés a RE, ya que se vio favorecido el crecimiento intracelular del bacilo. En conjunto los resultados sugieren que CEBP α se ve activado principalmente por efecto de estrés a RE inducido por Mtb, y que este factor nuclear participa en el control de la infección promoviendo la eliminación del bacilo, probablemente al inducir la expresión de LL-37.

Por otra parte, el suero es el principal componente utilizado como factor de crecimiento en cultivo celular, y aunque se desconoce su composición exacta se sabe que contiene diferentes aminoácidos, elementos traza, hormonas, ácidos grasos y vitaminas [29]. Considerando la capacidad de la vitamina D para inducir la expresión de LL-37, decidimos utilizar como alternativa el sustituto FA que contiene factores nutricionales definidos que permiten el cultivo celular, y es libre de citocinas, hormonas y vitaminas [30]. Para corroborar la funcionalidad de las células cultivadas con FA se procedió a evaluar la capacidad de internalización de Mtb en las células de epitelio respiratorio, y la expresión de CD68, así como la monitorización de la morfología como indicador de diferenciación en los hMDMs. Aunque parece haber una diferencia morfológica sutil en los hMDMs, no se encontraron diferencias significativas entre las células cultivadas con suero y cultivadas con el sustituto FA en ninguno de los dos tipos celulares evaluados. Por lo tanto, las diferencias observadas en los siguientes experimentos no se debieron al cambio del suero en

el medio de cultivo celular.

Adicionalmente, en las células epiteliales no se encontró diferencia significativa en la inducción de la expresión de CEBP α , independientemente de la presencia de vitamina D en el medio, es decir, la activación del factor nuclear durante la infección por Mtb no se ve condicionada por la vitamina D. Como ya se ha descrito, además de su función de barrera física, las células epiteliales son capaces de contribuir a la respuesta inmune local mediante la secreción de citocinas y AMPs al reconocer estructuras conservadas en microorganismos patógenos. Estas células, consideradas no profesionales, promueven el reclutamiento y activación de células inmunes profesionales [43]. Por tanto, nuestros resultados sugieren la activación de CEBP α como un mecanismo conservado y de defensa primaria en la infección con Mtb en células epiteliales. La activación de CEBP α probablemente sea inducido por la capacidad el bacilo Mtb de inducir estrés al RE, que a su vez promueve un incremento en la secreción de LL-37, y por ende la célula adquiere mayor capacidad bactericida. La inducción del estrés al RE podría corroborarse utilizando inhibidores de la vía de activación UPR, y la secreción de LL-37 puede corroborarse mediante un ensayo de ELISA.

En contraste, cuando los hMDMs infectados fueron cultivados en suero humano (SH) no se observó inducción de la expresión de CEBP α , misma que incrementó significativamente cuando las células fueron cultivadas con el sustituto FA, lo que nos puede indicar que la expresión de CEBP α se ve condicionada por la vitamina D. Estudios filogenéticos han propuesto al VDR como un factor de transcripción crítico con más de 400 millones de años de evolución [44], y se sugiere que su capacidad inmunomoduladora está incluso más especializada que su papel en la modulación del calcio [45]. Asimismo, estudios de secuenciación han mostrado que el genoma de los monocitos es especialmente sensible a la vitamina D. Concentraciones por debajo de los nanomoles son suficientes para activar el receptor VDR, que tiene una gran cantidad de genes blanco involucrados con la respuesta inmune en este tipo celular [46]. De forma complementaria se ha propuesto a CEBP α como un potenciador de VDR, ya que ambos factores actúan

en conjunto durante la diferenciación mieloide y son clave para el desarrollo de macrófagos inmunológicamente activos [45]. En este mismo tipo celular, se ha reportado que la activación de CEBP α se ve altamente influida por la vitamina D, ya que promueve diferencialmente su localización y modula su fuerza de unión en genes blancos de VDR. Principalmente se ha descrito que CEBP α está involucrado en las respuestas inmunes innatas inducidas por la vitamina D [47] y que la activación de este factor nuclear es una respuesta secundaria en la cascada de señalización de la vitamina D en monocitos [48]. Considerando que en nuestros resultados observamos que en los hMDMs cultivados en medio suplementado con suero e infectados con Mtb no se indujo la expresión de CEBP α , esto pudiera sugerir que la presencia de la vitamina D en el suero modula la activación transcripcional en los hMDMs, y que probablemente no detectamos la expresión de CEBP α , ya que es considerado un factor de activación tardío. En contraste cuando los hMDMs fueron cultivados en un medio libre de vitamina D, probablemente se indujo la expresión de CEBP α como un mecanismo alternativo a la activación de VDR para controlar la infección por Mtb, lo que refleja la complejidad y la jerarquía de las respuestas inmunes en cada tipo celular, dependiendo de los nutrientes disponibles en el microambiente.

Considerando los nuevos hallazgos sobre la participación de CEBP α en la eliminación de la micobacteria en células infectadas, y la capacidad de la vitamina D para modular su expresión, la activación conjunta de ambos factores de transcripción podría mostrar una sinergia en la respuesta frente de Mtb. En nuestros resultados de la evaluación del crecimiento intracelular observamos que las células tratadas con la vitamina D en donde se inhibió la activación de CEBP α mostraron una pérdida significativa del control del crecimiento de la micobacteria en comparación de cuando CEBP α no fue inhibido, lo que apoya la hipótesis de que su activación conjunta incrementa la respuesta bactericida frente a la infección con Mtb, que pudiera ser mediante la inducción de LL-37. En este sentido se ha propuesto a VDR como un sensor de los cambios ambientales que dirigen a la respuesta inmune y a CEBP α como un potenciador diferencial de las respuestas de VDR en células inmunes profesionales.

IX. Conclusión

La infección por Mtb induce la expresión del factor nuclear CEBP α , el cual es necesario para controlar el crecimiento intracelular del bacilo de manera más eficaz en células de epitelio pulmonar y hMDMs. Adicionalmente, en hMDMs la expresión de CEBP α se ve condicionada por la vitamina D. En conjunto los resultados sugieren a CEBP α como posible inductor o potenciador de la respuesta inmune en la infección por TB.

X. Bibliografía

1. Brites, D. and S. Gagneux, *The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis Complex*. Adv Exp Med Biol, 2017.
2. Organization, W.H. *Global tuberculosis report 2020*. 2020; Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
3. Jilani, T., et al. *Active tuberculosis*. 2020; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513246/>.
4. Maertzdorf, J., et al., *Mycobacterium tuberculosis Invasion of the Human Lung: First Contact*. Front Immunol, 2018.
5. Tellez, G.A. and J.C. Castaño, *Antimicrobial peptides*. Infectio, 2010.
6. Vandamme, D., et al., *A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide*. Cell Immunol, 2012.
7. Rivas-Santiago, B., et al., *Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases*. Salud Pública de México, 2006. 48.
8. Rivas-Santiago, B., et al., *Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells*. Infect Immun, 2008.
9. Torres-Juarez, F., et al., *LL-37 Immunomodulatory Activity during Mycobacterium tuberculosis Infection in Macrophages*. Infect Immun, 2015.
10. Castañeda-Delgado, J., et al., *Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis*. Clin Exp Immunol, 2010.

11. Majewski, K., et al., *Serum level of cathelicidin LL-37 in patients with active tuberculosis and other infectious diseases*. J Biol Regul Homeost Agents, 2017.
12. Yamshchikov, A., et al., *Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis*. Am J Clin Nutr, 2010.
13. Majewski, K., et al., *Status of cathelicidin IL-37, cytokine TNF, and vitamin D in patients with pulmonary tuberculosis*. J Biol Regul Homeost Agents, 2018.
14. Rahman, S., et al., *Pulmonary tuberculosis patients with a vitamin D deficiency demonstrate low local expression of the antimicrobial peptide LL-37 but enhanced FoxP3+ regulatory T cells and IgG-secreting cells*. Clin Immunol, 2015.
15. Sorensen, O., et al., *The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils*. Blood, 1997.
16. Büchau, A., et al., *The Host Defense Peptide Cathelicidin Is Required for NK Cell-Mediated Suppression of Tumor Growth*. J Immunol, 2010.
17. Nardo, A., A. Vitiello, and R. Gallo, *Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide*. J Immunol, 2003.
18. Park, K., et al., *Regulation of Cathelicidin Antimicrobial Peptide Expression by an Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling, Vitamin D Receptor-independent Pathway*. J Biol Chem, 2011.
19. Sorensen, O., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. Blood, 2001.
20. Talat, N., et al., *Vitamin D Deficiency and Tuberculosis Progression*. Emerg Infect Dis, 2010.
21. Nnoaham, K. and A. Clarke, *Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. Int J Epidemiol, 2008.
22. Dhawan, P., et al., *C/EBP α and the Vitamin D Receptor Cooperate in the Regulation of Cathelicidin in Lung Epithelial Cells*. J Cell Physiol, 2015.
23. NCBI. *CEBPA CCAAT enhancer binding protein alpha [Homo sapiens (human)]*. 2021; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=1050>

24. Dhawan, P., R. Weider, and S. Christakos, *CCAAT Enhancer-binding Protein α Is a Molecular Target of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in MCF-7 Breast Cancer Cells*. J Biol Chem, 2009.
25. Hau, C., et al., *Visfatin enhances the production of cathelicidin antimicrobial peptide, human β -defensin-2, human β -defensin-3, and S100A7 in human keratinocytes and their orthologs in murine imiquimod-induced psoriatic skin*. Am J Pathol, 2013.
26. Peñuelas-Urquides, K., et al., *Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units*. Braz J Microbiol, 2013.
27. Livak, K.-J. and T.-D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001.
28. brand, R.D.S.a.b. *Fetal Bovine Serum (FBS): Products*. Available from: <https://www.rndsystems.com/target/fetal-bovine-serum-fbs>.
29. Johnson, M., *Fetal bovine serum*. Labome, 2012.
30. Biowest, t.s.s. *FreeAdd 1X, technical data sheet*. 2018; Available from: https://www.biowest.net/media/biowest_tds_freeadd_1x_s6010.pdf.
31. Wei, R., et al., *PU.1 and epigenetic signals modulate 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and C/EBP α regulation of the human cathelicidin antimicrobial peptide gene in lung epithelial cells*. J Cell Physiol, 2019.
32. Saiffe-Farías, A.F., et al., *Predicting functional regulatory SNPs in the human antimicrobial peptide genes DEFB1 and CAMP in tuberculosis and HIV/AIDS*. Comput Biol Chem, 2015.
33. Wedel, A. and H. Ziegler-Heitbrock, *The C/EBP Family of Transcription Factors*. Immunobiology, 1995.
34. Stein, B., P. Cogswell, and B. AS, *Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction*. Mol Cell Biol, 1993.
35. University, B. *NF-kB Transcription Factors, Target Genes*. Available from: <https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>.
36. Kerckhove, M., et al., *Targeting miR-223 in neutrophils enhances the clearance of Staphylococcus aureus in infected wounds*. EMBO Mol Med, 2018.

37. Zhao, T., et al., *HTLV-1 bZIP factor supports proliferation of adult T cell leukemia cells through suppression of C/EBP α signaling*. *Retrovirology*, 2013.
38. Schmitz, L., et al., *The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF- κ B: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection*. *Biomedicines*, 2018.
39. Choi, H.-H., et al., *Endoplasmic reticulum stress response is involved in Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis*. *FEBS Lett*, 2010.
40. Cui, Y., et al., *The endoplasmic reticulum stress response: A link with tuberculosis?* *Tuberculosis*, 2016.
41. Lim, Y.-J., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress Pathway-Mediated Apoptosis in Macrophages Contributes to the Survival of Mycobacterium tuberculosis*. *Plos One*, 2011.
42. Lim, Y.-J., et al., *Mycobacterium tuberculosis 38-kDa antigen induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via toll-like receptor 2/4*. *Apoptosis*, 2015.
43. Bissonnette, E., et al., *Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis*. *Front Immunol*, 2020.
44. Bouillon, R. and T. Suda, *Vitamin D: calcium and bone homeostasis during evolution*. *Bonekey Rep*, 2014.
45. Carlberg, C., *Vitamin D Signaling in the Context of Innate Immunity: Focus on Human Monocytes*. *Front Immunol*, 2019.
46. Seuter, S., A. Neme, and C. Carlberg, *Epigenome-wide effects of vitamin D and their impact on the transcriptome of human monocytes involve CTCF*. *Nucleic Acids Res*, 2016.
47. Nurminem, V., et al., *Modulation of vitamin D signaling by the pioneer factor CEBPA*. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019.
48. Warwick, T., et al., *A hierarchical regulatory network analysis of the vitamin D induced transcriptome reveals novel regulators and complete VDR dependency in monocytes*. *Scientific reports*, 2021.