



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EL CALCITRIOL INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE  
ÓXIDO NÍTRICO Y MODULA LA CAPACIDAD  
MICROBICIDA CONTRA *Mycobacterium bovis* EN  
MACRÓFAGOS DE BOVINO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**ÁNGEL GARCÍA BARRAGÁN**

**ASESORES:**

MVZ Edgar Alfonseca Silva  
MVZ José Ángel Gutiérrez Pabello



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

A mis padres Ángel García Paredes y Ernestina Barragán Ramírez por su apoyo, confianza, paciencia y sobre todo por la motivación que me dieron hasta el último momento de la culminación de mis estudios y titulación.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

En primera instancia al Dr. Edgar Alfonseca Silva por su apoyo, asesoría, pláticas, experiencias y por enseñarme las técnicas y métodos que me sirvieron demasiado para realizar los experimentos, resolver los problemas que surgieron durante la etapa experimental y en la escritura de este trabajo tanto en el artículo científico y la presente tesis. Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por su apoyo por permitirme el uso de su laboratorio para realizar mi trabajo de investigación.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por sus comentarios en la revisión de este escrito y las correcciones aplicadas en el mismo.

A mis compañeros de laboratorio, M en C Anaid Maciel Rivera por su apoyo, amistad y consejos durante este tiempo; a la Dra. Cristina Ibarra Zazueta por su apoyo y amistad y también por brindarme material biológico para que pudiera practicar las técnicas empleadas en el laboratorio cuando apenas iniciaba esta investigación, a Pablo Vera Sanchez por su valiosa amistad, consejos, generosidad y apoyo en la preparación de los medios de cultivo para que pudiera realizar mis experimentos.

Al Dr. Francisco Aguilar Romero por su apoyo desde que inicie la carrera y que me motivó para enfocarme a la microbiología y la investigación; a la Dra. Beatriz Arellano Reynoso por su valioso apoyo en los seminarios y las facilidades en el laboratorio para que pudiera realizar mi investigación.

A mis amigos y compañeros de la carrera que me apoyaron motivándome en los momentos difíciles para no darme por vencido en la culminación de este trabajo.

A mi familia por la comprensión y apoyo en especial a mis padres Ángel García y Ernestina Barragán, por su paciencia, comprensión, cariño y siempre darme su mano para que saliera adelante hasta el último momento de mi vida escolar.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa de estudios con mayor vanguardia y avances científicos en el país y por permitirme crecer académica y personalmente; a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las enseñanzas que me brindaron sus profesores en todo este tiempo.

Finalmente agradezco a los proyectos (PAPIIT) UNAM IN-220615 "Evaluación del efecto inmunomodulador de la Vitamina D en la viabilidad de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino" por el financiamiento para realizar esta investigación y CONACYT CB-167488 por la beca otorgada.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	19
REFERENCIAS	25
FIGURAS	32

## RESUMEN

GARCÍA BARRAGÁN ANGEL. El calcitriol incrementa la producción de óxido nítrico y modula la capacidad microbicida contra *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino (bajo la dirección de: MVZ Edgar Alfonseca Silva y MVZ José Ángel Gutiérrez Pabello)

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa reemergente causada por *Mycobacterium bovis* que puede transmitirse a los humanos. La prevalencia mundial de *M. bovis* en humanos se subestima y representa un riesgo grave para la salud pública en los países en desarrollo. A la luz de esta situación, es importante tener en cuenta que nuestra comprensión de la inmunopatogenia de la tuberculosis humana puede ser mejorada mediante el estudio de esta enfermedad en el modelo bovino. La estimulación del sistema inmune innato bovino con calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) conduce al incremento de moléculas bactericidas en macrófagos involucradas en la actividad antimicrobiana. Sin embargo, se desconoce si el efecto del calcitriol sobre los macrófagos bovinos afecta la replicación bacteriana intracelular. Con estas consideraciones en mente, este estudio buscó investigar el papel específico del calcitriol en el control de la tuberculosis en macrófagos bovinos, con la intención de descubrir información aplicable en la tuberculosis humana. Como tal, la infección con *M. bovis* demostró inducir la expresión génica de *CYP27B1* y *VDR* en macrófagos. Por otra parte, la adición de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a cultivos de macrófagos previamente infectados con

micobacterias y/o activados por LPS, desencadenó la expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (*NOS2*) y el aumento de la concentración de nitritos, ambos indicadores de la producción de óxido nítrico (ON). Por medio de un ensayo microbicida, la adición de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  incrementó la fagocitosis y disminuyó la replicación intracelular de las micobacterias. Por lo tanto, en conjunto, nuestros resultados demuestran que el calcitriol puede ayudar a estimular el sistema inmune innato de los bovinos mediante el aumento de la fagocitosis y la disminución de la replicación intracelular de *M. bovis* en macrófagos a través de la vía VDR.

Palabras clave: Calcitriol, macrófagos bovinos, capacidad microbicida, óxido nítrico, *Mycobacterium bovis*.

## SUMMARY

GARCÍA BARRAGÁN ANGEL. Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages (Directed by: MVZ Edgar Alfonseca Silva and MVZ José Ángel Gutiérrez Pabello)

Bovine tuberculosis, a re-emerging infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, can be transmitted to humans. Global prevalence of *M. bovis* in humans is underestimated and represents a serious public health risk in developing countries. In light of this situation, it is important to note that our understanding of the immunopathogenesis of human tuberculosis can be improved by studying this disease in the bovine model. Stimulation of the bovine innate immune system with calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) leads to an increase in bactericidal molecules involved in macrophage antimicrobial activity. It is unknown, however, if calcitriol's effect on bovine macrophages impacts intracellular bacterial replication. With these considerations in mind, this study sought to investigate the specific role of calcitriol in tuberculosis control in bovine macrophages, in the hopes of uncovering information applicable to human tuberculosis. As such, infection with *M. bovis* was shown to induce expression of *CYP27B1* and *VDR* genes in macrophages. Moreover, addition of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> to cultures of macrophages previously infected with mycobacteria and/or activated by LPS triggered cellular expression of nitric oxide synthase (*NOS2*) and increased nitrite concentrations, both indicators of nitric oxide (NO) production. By means of a microbicidal assay, addition of



1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was seen to increase macrophage phagocytosis and to decrease mycobacterial intracellular replication. Thus, taken together, our results show that calcitriol can help stimulate the innate immune system of bovines by increasing phagocytosis and decreasing intracellular replication of microorganisms, such as *M. bovis*, in macrophages, through the VDR pathway.

*Keywords:* Calcitriol, bovine macrophages, microbicidal capacity, nitric oxide, *Mycobacterium bovis*.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es considerada una de las enfermedades infecciosas más estudiadas en el mundo. *Mycobacterium bovis*, es una bacteria que pertenece al complejo *M. tuberculosis* que afecta principalmente al ganado bovino, pero también es responsable de muchos casos de tuberculosis en humanos. La prevalencia global de *M. bovis* en humanos se subestima, lo que representa un riesgo significativo para salud pública en los países en desarrollo (Sternberg Lewerin, 2015). El modelo bovino puede explicar algunos aspectos desconocidos de la respuesta inmune en la tuberculosis humana, ofreciendo nuevas oportunidades para mejorar nuestra comprensión de la inmunopatogenia de esta importante enfermedad (Waters *et al.*, 2011).

La inmunidad innata es un sistema evolutivamente conservado que representa la primera línea de defensa de un animal contra la enfermedad. Es crucial para la rápida activación de mecanismos de respuesta antimicrobiana contra los patógenos, que a su vez son detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los Toll Like Receptors (TLR) (Beutler, 2009; Kawai y Akira, 2010). Algunas funciones importantes de la inmunidad innata son reguladas por el calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), que es la una forma activa de vitamina D. Esta hormona liposoluble es derivada del colesterol, también es responsable de la regulación de la homeostasis del calcio durante el período periparto y la lactancia, una función importante muy estudiada en el ganado bovino (Horst, Goff y Reinhardt, 1997, 2003).

Los precursores de vitamina D se obtienen principalmente a partir de fuentes alimenticias limitadas (vitamina D<sub>2</sub>) o mediante la conversión fotoquímica de 7-dehidrocolesterol (vitamina D<sub>3</sub>) en la piel expuesta a la radiación solar ultravioleta B (290-315 nm; ) (Ströhle, Wolters y Hahn, 2011). Como ninguno de estos metabolitos posee actividad biológica, tienen que someterse a dos modificaciones con el fin de llegar a ser biológicamente activos (Zhang y Naughton, 2010). En primer lugar, ambas formas de vitamina D son hidroxilados en el hígado en la posición 25 por enzimas del complejo citocromo P-450 (CYP2R1, CYP27A1 y CYP2D25) con el fin de producir calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>), la forma de vitamina D más comúnmente encontrada en la circulación sanguínea; posteriormente el calcidiol se convierte en calcitriol por la enzima mitocondrial CYP27B1, también conocida como 1- $\alpha$  hidroxilasa (Blomberg, 2014; Christakos *et al.*, 2016). La mayor parte del calcitriol del cuerpo se sintetiza en los túbulos proximales del riñón; sin embargo, la síntesis de calcitriol también puede ocurrir en varios sitios extra - renales en células que expresan CYP27B1 (Christakos *et al.*, 2016).

La activación de monocitos y macrófagos humanos a través de TLR2 / 1 conduce a la síntesis de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por la enzima como 1- $\alpha$  hidroxilasa en el sitio de infección (Liu *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2013). Esto sugiere que la vitamina D activa es crítica para el control de patógenos intracelulares (Hewison, 2011) a través de la activación de múltiples genes, tales como los que codifican para péptidos antimicrobianos como beta-defensinas y catelicidina, que contienen sitios específicos en sus promotores conocidos como elementos de

respuesta a la vitamina D (VDREs) (Liu *et al.*, 2009). Por lo tanto, la actividad antimicrobiana depende en parte de la vía de señalización de la vitamina D, haciendo de este un factor significativo en la destrucción exitosa de patógenos intracelulares tales como *M. tuberculosis* en monocitos y macrófagos humanos (Crowle, Ross y May, 1987; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Hewison, 2011; Verway *et al.*, 2013). Adicionalmente, diversos estudios han evaluado el efecto de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en la respuesta inmune innata en el ganado bovino e indican que esta vitamina es esencial para el control de *M. bovis*, el agente causal de la tuberculosis bovina (Nelson *et al.*, 2012).

Además de la producción de beta-defensina, los monocitos bovinos también requieren vitamina D activa para producir óxido nítrico (ON) (Nelson *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2011; Merriman *et al.*, 2015). En los macrófagos, el ON se ha asociado con una mayor restricción del crecimiento intracelular, así como la eliminación *per se*, de *M. bovis* (Nozaki *et al.*, 1997; Esquivel-Solís *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel de la vitamina D en el control de *M. bovis* por los macrófagos bovinos no se entiende completamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el papel funcional de la vitamina D en la capacidad microbicida de los macrófagos para restringir el crecimiento intracelular de *M. bovis*.

## **JUSTIFICACIÓN**

Se desconoce el papel del calcitriol en la producción de óxido nítrico y la capacidad microbicida contra el patógeno intracelular *Mycobacterium bovis* en el modelo de macrófagos de bovino.

## **HIPÓTESIS**

El calcitriol incrementa la producción de óxido nítrico y mejora la capacidad microbiciada en los macrófagos de bovino para matar a *M. bovis*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto modulador del calcitriol en la producción de óxido nítrico y el control intracelular de *M. bovis* en el modelo de macrófagos de bovino.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Detectar la producción de óxido nítrico en macrófagos de bovino desafiados con *M. bovis* y estimulados con calcitriol mediante la medición de los nitritos en los sobrenadantes de cultivo por el ensayo de Griess.
- Determinar la sobrevivencia intracelular de *M. bovis* evaluando la capacidad microbiciada de los macrófagos de bovino estimulados con calcitriol mediante el conteo de UFC y la determinación del porcentaje de sobrevivencia utilizando un ensayo microbiciada.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Animales**

Los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la normatividad sobre el uso de animales en la investigación establecidos por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron seleccionados como donantes de sangre periférica de un hato libre de tuberculosis Holstein Friesian (no expuesto y no vacunado) del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, FMVZ-UNAM.

### **Reactivos**

Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O26: B6 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), se preparó a una concentración de 1mg/ml en PBS 1x y se almacenó a -20°C. La vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), se diluyó en etanol puro grado molecular a una concentración de 10 µg/ml y se almacenó a -80°C en condición de oscuridad.

### **Bacterias**

La cepa de referencia internacional *Mycobacterium bovis* AN5, se cultivó en agitación constante a 37°C en medio líquido Middlebrook 7H9, enriquecido con 10% de OADC (Becton, Dickinson, Sparks, MD, USA) y 0.5 g/l de Tween 80 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Las bacterias se lavaron dos veces con PBS 1x y posteriormente se resuspendieron en medio fresco CRPMI

(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) adicionado con 15% de suero fetal bovino (Gibco® by Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Las bacterias fueron cosechadas, alicuotadas y mantenidas a -80°C hasta su uso. La concentración de micobacterias se determinó mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en placas de agar Middlebrook 7H10 (Becton, Dickinson, Sparks MD, USA).

### **Purificación de macrófagos bovinos**

Los macrófagos fueron obtenidos de células mononucleares de sangre periférica de bovino (CMSPB) como se describió anteriormente (Alfonseca-Silva, Hernández-Pando y Gutiérrez-Pabello, 2016); con algunas modificaciones. La sangre fue colectada por punción de la vena yugular en jeringas de 60 ml con ácido cítrico dextrosa en condiciones asépticas. Los PBMC fueron aislados por gradiente de Histopaque a una densidad específica de 1.077 g/ml (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) Las células fueron lavadas y resuspendidas en medio fresco CRPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio y 20 mM de bicarbonato de sodio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA ) y se incubaron en placas de ultra baja adherencia de 6 pozos (Costar®, Corning Incorporate, NY, USA ) durante 2 horas a 37° C con 5% CO<sub>2</sub>. Las células no adherentes fueron removidas y las células adherentes se cultivaron en CRPMI adicionado con 12% de suero autólogo por 12 días hasta su diferenciación a macrófago. Las células se cosecharon con una solución fría de PBS 1x con 2 mM de EDTA y se sembraron en placas de cultivo celular de 24 pozos (Costar®,

Corning Incorporate, NY, USA). Para determinar la expresión génica de *CYP24A1* y *VDR*,  $5 \times 10^5$  macrófagos fueron sembrados y estimulados con 4, 20 y 40 ng/ ml de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas en una atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)**

Un total de  $5 \times 10^5$  macrófagos se infectaron con *M. bovis* AN5 a una multiplicidad de infección de 2 bacterias por macrófago (MOI) 2: 1. Fueron tratados con o sin 4 ng/ml de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , y con o sin 100 ng/ml de LPS de *E. coli* O26: B6 durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta uso. El ARN total de los macrófagos se aisló usando reactivo TRIzol y se purificó con DNase I y RNase free, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). La integridad y calidad del ARN fueron evaluados utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Safe (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), y por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, Wilmington, DE, USA) en agua libre de nucleasas dentro de un rango de lectura de 260 a 280 nm.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó utilizando el kit de síntesis de ReverAid H Minus First Strand, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). El ADNc se diluyó 1 en 10 en agua libre de nucleasas y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.



## PCR en Tiempo Real

Se utilizaron iniciadores específicos para la detección de genes *CYP24A1*, *NOS2*, *VDR* y *CYP27B1* publicado previamente (Nelson *et al.*, 2011). *RPL32* se utilizó como control interno. Los iniciadores se diseñaron con el software IDT's Primer QuestSM, usando la siguiente secuencia: 5' - AAG GGC CAG ATC TTG ATG CC - 3' hacia adelante y 5'-CTT GAC GTT GTG GAC CAG GA-3' inversa. El PCR Tiempo Real se realizó utilizando un termociclador LightCycler 480 y con SYBR Green I Master Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como un sistema de detección, cumpliendo con las instrucciones del fabricante. La especificidad de cada iniciador se verificó usando el análisis de la curva de melting y en gel de agarosa para la detección de productos de PCR no específicos. El ciclo umbral (Ct) de cada muestra se empleó para determinar la expresión génica en unidades de expresión relativa (URE s), utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## Medición de la producción de óxido nítrico

Los nitritos ( $\text{NO}_2$ ) se midieron en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos como indicador de la producción de óxido nítrico (NO), utilizando el reactivo de Griess (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 550 nm ( $A_{550}$ ) en un lector de microplacas ELx808 (BioTek, Winooski, VT, USA). La concentración micromolar ( $\mu\text{M}$ ) de  $\text{NO}_2$  se calculó con una curva estándar de nitritos con medio de cultivo fresco CRPMI adicionado con 12% de suero autólogo.

## Ensayos microbicidas

Los ensayos microbicidas se realizaron como se describió anteriormente (Qureshi, Templeton y Adams, 1996), pero con algunas modificaciones. Un total de  $5 \times 10^4$  macrófagos por pozo se sembraron en dos placas de cultivo de 96 pocillos de cultivo (una para la fagocitosis y otra para la supervivencia) (Costar®, Corning Incorporate, USA). Las células se infectaron con *M. bovis* AN5 con una MOI de 20:1 y se estimularon o no con 100 ng/ml de LPS de *E. coli* O26: B6, y se trataron con o sin 4 ng/ml de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Las placas se centrifugaron a 200xg durante 1 min y se incubó a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 horas en una atmósfera húmeda para permitir la fagocitosis. Después de cuatro horas de incubación, las células procedentes de ambas placas se lavaron con cRPMI fresco para remover las bacterias extracelulares. En la placa de la fagocitosis, en el último lavado, el cRPMI se reemplazó con 50  $\mu\text{l}$  de 0,5% de Tween 20 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), y se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente para lisar los macrófagos y favorecer la liberación de micobacterias. Luego, se adicionó de PBS 1x y se realizaron diluciones decuples seriadas. El recuento de UFC se completó después de que cada dilución se sembró en placas de agar Middlebrook 7H10. Esto se consideró tiempo T0 (tiempo cero). Se añadió una cantidad de 100  $\mu\text{l}$  de medio cRPMI a la placa de supervivencia, que a su vez fue enriquecido con 12% de suero autólogo con o sin 100 ng/ml de LPS de *E. coli* O26: B6, y con o sin 4 ng/ml de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La placa se incubó durante 24 horas en las condiciones descritas anteriormente, y luego se cosechó de manera similar a

la primera placa. Este se consideró T24 (24 h). La supervivencia intracelular se calculó usando la relación de micobacterias supervivientes en T24 y micobacterias fagocitadas durante T0. Los resultados obtenidos se expresan como la media de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas internas.

### **Análisis estadístico**

Cada experimento se realizó de forma independiente y por triplicado, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó una prueba t de Student como prueba paramétrica y se realizó una prueba de Tukey para comparar tratamientos múltiples.

Se utilizó paquete estadístico GraphPad Prism Windows 6.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Un valor de  $P \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### **Evaluación de la funcionalidad y activación del receptor de la vitamina D en macrófagos bovinos.**

Con el fin de evaluar la funcionalidad y la activación del receptor de la vitamina D en los macrófagos de la especie bovina, como se ha demostrado anteriormente en los macrófagos humanos (Liu *et al.*, 2006), estas células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (4, 20 y 40 ng/ml) y se midió la expresión génica de *CYP24A1* y *VDR* por PCR Tiempo Real. El tratamiento con  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  indujo un incremento significativo dependiente de la dosis en la expresión de *CYP24A1*. La expresión de *CYP24A1* fue 338 veces mayor en las células tratadas con 40 ng/ml de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  que en las células no estimuladas ( $P \leq 0,001$ ; Figura 1A). Se observó que la expresión del gen *VDR* permanece constante independientemente de la concentración de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Figura 1B). Se observaron resultados similares cuando células mononucleares de sangre periférica de bovino (CMSPB) se trataron con las mismas condiciones experimentales (Figura 1C y Figura 1D). Estos resultados indican que el receptor de vitamina D está presente en los macrófagos de bovino, y que el calcitriol induce la producción de *CYP24A1*-25-hidroxilasa, una enzima mitocondrial del citocromo P450 que cataboliza a la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en los macrófagos de bovino. Estos resultados nos permiten validar nuestro modelo experimental de macrófagos bovinos.

## **Contribución de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en la activación de macrófagos mediante el incremento de la producción de óxido nítrico y la expresión del gen *NOS2*.**

Para determinar los efectos de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sobre la producción de ON y la expresión del gen *NOS2*, se estimularon macrófagos bovinos previamente activados con 100 ng/ml de LPS con diferentes concentraciones de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Se observó que mientras la concentración de nitritos ( $P \leq 0.0001$ , Figura 2A) y la expresión del gen *NOS2* ( $P \leq 0.05$ ; Figura 2B) se incrementó en macrófagos activados por LPS, estos resultados fueron incluso mayores en macrófagos que además fueron tratados con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $P \leq 0.001$ ; Figura 2A y  $P \leq 0.01$ ; Figura 2B, respectivamente). Después de la activación e incubación con LPS con diferentes concentraciones de calcitriol, la producción de nitritos se incremento y se mantuvo constante (Figura 2A); mientras que la expresión de *NOS2* era dependiente de la dosis (Figura 2B). Sin embargo, la estimulación de macrófagos con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sin activación previa de LPS no incrementó la concentración de nitritos o la expresión del gen *NOS2*. Estos resultados muestran que la activación de macrófagos es necesaria para lograr los efectos de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en la producción de óxido nítrico.

## **La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> incrementa la producción de óxido nítrico durante la infección micobacteriana.**

Con el fin de establecer los efectos del 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sobre la producción de óxido nítrico y la expresión del gen *NOS2* durante la infección micobacteriana, los

macrófagos bovinos fueron desafiados con *M. bovis* AN5 a una MOI de 2:1 y estimulados o no con 100 ng/ml de LPS y tratados con o sin 4 ng/ml de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Se encontró que la producción de nitritos ( $P \leq 0.001$ ; Figura 3A) y la expresión del gen *NOS2* ( $P \leq 0.05$ ; Figura 3B) fueron significativamente mayores en los macrófagos infectados y tratados con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, en comparación con los macrófagos infectados no tratados o en reposo. La activación de macrófagos inducida por LPS, sin embargo, aumentó significativamente estos dos valores en macrófagos infectados tratados con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $P \leq 0,001$ ; Figura 3A y  $P \leq 0,01$ ; Figura 3B, respectivamente). Estos resultados demuestran que 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> incrementa la producción de óxido nítrico en los macrófagos bovinos durante la infección micobacteriana, y que esto puede estar relacionado con una capacidad mejorada para controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis*.

### **La expresión génica de *CYP27B1* y *VDR* es inducida por la infección micobacteriana en macrófagos bovinos.**

Para profundizar en los mecanismos de los macrófagos para expresar *CYP27B1* y *VDR* en respuesta a la infección por *M. bovis*, los macrófagos se infectaron a una multiplicidad de infección de 2 bacterias por macrófagos (MOI) de 2: 1. Los resultados revelaron que, en comparación con los controles, la expresión génica de *CYP27B1* ( $P \leq 0.05$ ; Figura 4A) y *VDR* ( $P \leq 0.05$ ; Figura 4B) se incrementó significativamente en los macrófagos infectados. Sin embargo, la adición de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no indujo ningún cambio adicional en la expresión de estos genes en los macrófagos.

## **La supervivencia intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos es modulada por la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.**

Una vez que determinamos que la producción de ON se incrementó durante la infección micobacteriana en presencia de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, los macrófagos se infectaron a una MOI de 20: 1 con *M. bovis* AN5, y se estimularon o no con 100 ng/ml de LPS y con o sin 4 ng/ml de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> durante 24 horas; esto se hizo con la finalidad de evaluar la supervivencia de las micobacterias fagocitadas. El tratamiento de macrófagos con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aumentó la fagocitosis ( $P \leq 0.05$ , Figura 5A) y disminuyó significativamente la replicación intracelular de las micobacterias en comparación con los macrófagos no tratados ( $1.14 \times 10^6$  y  $1.79 \times 10^6$  UFC, respectivamente) ( $P \leq 0.0001$ , Figura 5A, 5B ) Es interesante observar que la activación de macrófagos con LPS además del tratamiento con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> redujo significativamente, en una orden de magnitud, la replicación bacteriana, en comparación con los macrófagos tratados únicamente con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $3.39 \times 10^5$  y  $1.14 \times 10^6$  UFC, respectivamente). ( $P \leq 0.0001$ , Figura 5A). Estos resultados demuestran que 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tiene un efecto modulador sobre los macrófagos, que influye en la respuesta inmune y el control del crecimiento de *M. bovis*; además, muestran que la activación de los macrófagos es esencial para mejorar el control de la replicación bacteriana.

## DISCUSIÓN

La tuberculosis bovina (*M. bovis*) es una enfermedad zoonótica que causa tuberculosis en humanos. Esta enfermedad es común en los países en desarrollo, causando grandes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción y las restricciones comerciales para el ganado bovino. La infección en humanos puede ocurrir como resultado del contacto directo o al ingerir leche no pasteurizada y otros productos lácteos de vacas infectadas (Cosivi *et al.*, 1998; Grange, 2001; Müller *et al.*, 2013).

Estudios previos han informado que las vitaminas actúan como mediadores clave del sistema inmune innato regulando la actividad de los macrófagos y participando en la inmunomodulación de las funciones antibacterianas. El calcitriol se asocia con un aumento en la respuesta inmune del huésped contra los patógenos intracelulares, además de ser reconocida como un modulador vital de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas contra la tuberculosis. La deficiencia de vitamina D en humanos se ha considerado un factor de riesgo para desarrollar tuberculosis (Van Rhijn *et al.*, 2008; Talat *et al.*, 2010; Fabri *et al.*, 2011; Huang *et al.* 2017).

El calcitriol desempeña un papel importante en la capacidad innata de los macrófagos para restringir la replicación bacteriana. Nuestro estudio reveló por primera vez que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  está involucrada en la mejora de la capacidad microbicida de los macrófagos bovinos para restringir el crecimiento intracelular de *M. bovis*, así como en la modulación de la producción de ON durante la infección micobacteriana. En casos de mastitis bovina, otros autores han



demostrado que la administración intramamaria de 25(OH)D<sub>3</sub> permite a los macrófagos sintetizar 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, lo que a su vez reduce el recuento bacteriano y disminuye la gravedad de la enfermedad (Lippolis *et al.*, 2011), e incrementa la expresión génica de *NOS2* y de beta defensinas (Merriman *et al.*, 2017).

Las acciones biológicas de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> están mediadas por el receptor de vitamina D (Christakos *et al.*, 2016), que está presente en al menos 30 tejidos blanco diferentes (Nelson *et al.*, 2011). Además, *VDR* se expresa en la mayoría de las células del sistema inmune, incluidos los macrófagos, y su funcionalidad y activación se han evaluado con base a la expresión de la enzima *CYP24A1* (Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007), logrando resultados similares a los observados en este estudio (Figura 1A y Figura 1C). El gen *CYP24A1* codifica para la enzima mitocondrial *CYP24A1*-25-hidroxilasa, que es responsable de inactivar a la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por hidroxilación. Esta enzima se expresa en todas las células diana que contienen el receptor de vitamina D, protegiendo a estas células de la sobre activación de este receptor (Jones, Prosser and Kaufmann, 2012). El polimorfismo en el *VDR* sugiere una funcionalidad del receptor inadecuada y una mayor susceptibilidad a la tuberculosis (Liu *et al.*, 2004).

El óxido nítrico es una molécula importante para la destrucción de patógenos intracelulares en el ganado (Esquivel-Solís *et al.*, 2013). Estudios previos han demostrado la capacidad de calcitriol para promover la producción de óxido nítrico en células mononucleares bovinas derivadas de sangre periférica y estimuladas con diferentes antígenos de *M. bovis* o LPS (Waters *et al.*, 2001; C D Nelson *et al.*, 2010). Nuestro estudio demuestra que el calcitriol aumenta la producción de

óxido nítrico y la expresión del gen *NOS2* en macrófagos bovinos expuestos a *M. bovis*, incluidos los estimulados tanto con LPS como con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Figura 2A). Mediante el uso del modelo de macrófago bovino, varios autores han demostrado que la producción de óxido nítrico está implicada en la destrucción intracelular de micobacterias; este efecto se ha establecido adicionalmente al mostrar que el bloqueo de la producción de óxido nítrico con de nG-monometil-L-arginina monoacetato favorece la replicación de *M. bovis* en los macrófagos (Esquivel-Solís *et al.*, 2013).

La producción de óxido nítrico por los macrófagos bovinos se ha sugerido como un marcador de resistencia de la infección por *M. bovis* (Esquivel-Solís *et al.*, 2013); en el modelo humano, sin embargo, las catelicidinas han sido reconocidas como las principales moléculas bactericidas responsables de la eliminación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Liu *et al.*, 2007, 2009; Sonawane *et al.*, 2011).

La unión del receptor de vitamina D a los VDREs conduce a la activación de los genes dependientes de la vía de señalización de la vitamina D, como *DEFB4* y catelicidinas (Wang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). Sugerimos que el promotor del gen *NOS2* puede contener estos VDREs, así como los sitios de unión NF-kappa B, como se demostró previamente para *DEFB4* (Liu *et al.*, 2009). Además, nuestros resultados muestran que la activación de macrófagos mediante TLR es necesaria para que la vitamina D induzca directamente la expresión de genes que codifican moléculas bactericidas, como el óxido nítrico (Figuras 2 y 3).

Por otro lado, diferentes moléculas, como las beta defensinas, están involucradas en la mejora de la respuesta inmune innata en el ganado (Merriman *et al.*, 2015).

Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para demostrar el papel de las beta defensinas y la sinergia con otras vías microbicidas, como parte de la respuesta inmune innata de los macrófagos mediados por vitamina D.

Estudios recientes han demostrado que, en monocitos y macrófagos humanos y bovinos, después de la activación de TLR4 y TLR2 / 1, la síntesis de calcitriol es inducida a nivel intracelular por la enzima mitocondrial 1 -  $\alpha$  hidroxilasa (Liu *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2010). Este evento también regula la expresión del gen *VDR* (Liu *et al.*, 2006). En otros estudios, se demostró que la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  por las células CD14 + se incrementa durante las infecciones de las glándulas mamarias en el ganado (Nelson *et al.*, 2010). Sin embargo, la adición de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *CYP27B1* en monocitos bovinos (Nelson *et al.*, 2010). Las infecciones experimentales en bovinos con *M. bovis* han demostrado un aumento intracelular de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en células mononucleares dentro del granuloma (Rhodes *et al.*, 2003). Nuestros resultados demuestran que la activación de receptores de reconocimiento de patógenos en macrófagos infectados por *M. bovis* estimula la expresión de genes relacionados con la vía de señalización de la vitamina D para la síntesis *in situ* de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Figura 4). Esto, a su vez, aumenta los receptores de vitamina D, desencadenando una respuesta inmune innata efectiva e inmediata para el control de patógenos.

También se demostró que, en presencia de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , los macrófagos bovinos mostraron un aumento de la fagocitosis de micobacterias (Figura 5A). Este hallazgo está en línea con estudios previos que sugieren que la vitamina D

aumenta el potencial fagocítico de los macrófagos humanos contra *M. tuberculosis* (Chandra *et al.*, 2004), y que este proceso puede verse afectado en condiciones de deficiencia de vitamina D (Djukic *et al.*, 2014).

La vitamina D se ha relacionado durante mucho tiempo con la resistencia a la tuberculosis. Los datos que se muestran aquí sirven como evidencia de la importancia de la ruta de señalización de la vitamina D en los macrófagos bovinos infectados por *M. bovis*. Este descubrimiento aporta una nueva percepción del posible papel que desempeña la vitamina D en la inmunidad innata del ganado. Los datos en este estudio sugieren que la producción de óxido nítrico puede representar una importante respuesta antimicrobiana activada por la vía de la vitamina D en los macrófagos infectados. Creemos que nuestros resultados abren la puerta para futuras investigaciones sobre la contribución potencial y el mecanismo de la producción de óxido nítrico mediada por la vitamina D en el control de la enfermedad micobacteriana en el ganado, y nos ayuda a comprender los mecanismos innatos del macrófago para la destrucción de micobacterias, también mejora nuestro conocimiento de aquellos factores que contribuyen a mantener un sistema inmune fuerte. Además, nuestros resultados enfatizan que hay un nicho de oportunidad claro para la investigación del potencial terapéutico de los análogos de la vitamina D, que pueden representar una opción novedosa de tratamiento para diversas enfermedades humanas y del ganado. Mantener esta información en mente sería indudablemente ventajoso para probar la efectividad de las nuevas terapias con inmunomoduladores para los tratamientos de la tuberculosis.

En el contexto del concepto de “una sola medicina”, el modelo bovino facilita el estudio de enfermedades que son importantes en términos de salud pública, como la pandemia de tuberculosis. Aunque esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada, desconocemos los aspectos esenciales de la respuesta inmune implicada en el control de las micobacterias. Nuevos estudios como el que se realizó ofrecen nuevas oportunidades para expandir nuestro conocimiento sobre la tuberculosis.

## **CONCLUSIÓN**

En conclusión, nuestro estudio muestra que el calcitriol puede ayudar a estimular el sistema inmune innato bovino aumentando la fagocitosis y disminuyendo la replicación intracelular de *M. bovis* en los macrófagos a través de la vía VDR. Los macrófagos infectados por micobacterias o activados por LPS activan la vía de señalización de vitamina D e inducen la expresión de *CYP27B1* y *VDR*. Además, la adición de calcitriol a estos cultivos de macrófagos induce la sobreexpresión celular de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) y el aumento de las concentraciones de nitritos, ambos indicadores de la producción de óxido nítrico (NO) y, por lo tanto, una función microbiciada mejorada.

## REFERENCIAS

Adams, J.S., Rafison, B., Witzel, S., Reyes, R.E., Shieh, A., Chun, R., Zavala, K., Hewison, M., Liu, P.T. Regulation of the extrarenal CYP27B1-hydroxylase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013, 144PA, 22–27.

Alfonseca-Silva, E., Hernández-Pando, R., Gutiérrez-Pabello, J.A. *Mycobacterium bovis*-infected macrophages from resistant and susceptible cattle exhibited a differential pro-inflammatory gene expression profile depending on strain virulence. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016, 176, 34–43.

Beutler, B.A. TLRs and innate immunity. *Immunity.* 2009, 113, 1399–1407.

Blomberg, J.M. Vitamin D and male reproduction. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014. 10, 175–186.

Chandra, G., Selvaraj, P., Jawahar, M.S., Banurekha, V. V., Narayanan, P.R. Effect of vitamin D3 on phagocytic potential of macrophages with live *Mycobacterium tuberculosis* and lymphoproliferative response in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Immunol.* 2004, 24, 249–257.

Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* 2016. 96, 365–408.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F.A.K., de Kantor, I., Meslin, F.X., Zoonotic

tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 1998, 4, 59–70.

Crowle, A.J., Ross, E.J., May, M.H. Inhibition by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect. Immun.* 55, 1987. 2945–2950.

Djukic, M., Onken, M.L., Schütze, S., Redlich, S., Götz, A., Hanisch, U.K., Bertsch, T., Ribes, S., Hanenberg, A., Schneider, S., Bollheimer, C., Sieber, C., Nau, R. Vitamin D deficiency reduces the immune response, phagocytosis rate, and intracellular killing rate of microglial cells. *Infect. Immun.* 82, 2014. 2585–2594.

Esquivel-Solís, H., Vallecillo, A.J., Benítez-Guzmán, A., Adams, L.G., López-Vidal, Y., Gutiérrez-Pabello, J.A. Nitric Oxide Not Apoptosis Mediates Differential Killing of *Mycobacterium bovis* in Bovine Macrophages. *PLoS One.* 2013, 8, e63464.

Fabri, M., Stenger, S., Shin, D.M., Yuk, J.M., Liu, P.T., Realegeno, S., Lee, H.M., Krutzik, S.R., Schenk, M., Sieling, P.A., Teles, R., Montoya, D., Iyer, S.S., Bruns, H., Lewinsohn, D.M., Hollis, B.W., Hewison, M., Adams, J.S., Steinmeyer, A., Zügel, U., Cheng, G., Jo, E.-K., Bloom, B.R., Modlin, R.L. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci. Transl. Med.* 2011. 3, 104ra102.

Grange, J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis.* 2001. 81, 71–77.

Hewison, M. Antibacterial effects of vitamin D. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011. 7, 337–345.

Horst, R.L., Goff, J.P., Reinhardt, T.A. Calcium and Vitamin D Metabolism During Lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 1997. 2, 253–263.

Horst, R.L., Goff, J.P., Reinhardt, T.A. Role of Vitamin D in Calcium Homeostasis and Its Use in Prevention of Bovine Periparturient Paresis. *Acta. Vet. Scand.* 2003. 97, 35–50.

Huang, S.-J., Wang, X.-H., Liu, Z.-D., Cao, W.-L., Han, Y., Ma, A.-G., Xu, S.-F. Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis. *Drug. Des. Devel. Ther.* 2017. 11, 91–102.

Jones, G., Prosser, D.E., Kaufmann, M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. 523, 9–18.

Kawai, T., Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010. 11, 373–384.

Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Sacco, R.A., Nonnecke, B.J., Nelson, C.D. Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D 3. *PLoS One.* 2011. 6, e25479.

Liu, P.T., Stenger, S., Tang, D.H., Modlin, R.L. Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. *J. Immunol.* 2007. 179, 2060–2063.

Liu, P.T., Schenk, M., Walker, V.P., Dempsey, P.W., Kanchanapoomi, M., Wheelwright, M., Vazirnia, A., Zhang, X., Steinmeyer, A., Zügel, U., Hollis, B.W., Cheng, G., Modlin, R.L. Convergence of IL-1 $\beta$  and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One.* 2009. 4, e5810.

Liu, P.T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B.H., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D.L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U.,



Gallo, R.L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B.W., Adams, J.S., Bloom, B.R., Modlin, R.L. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D–Mediated Human Antimicrobial Response. *Science*. 2006. 311, 1770–1773.

Liu, W., Cao, W.-C., Zhang, C.-Y., Tian, L., Wu, X.-M., Habbema, J.D.F., Zhao, Q.-M., Zhang, P.-H., Xin, Z.-T., Li, C.-Z., Yang, H. VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2004. 8, 428–434.

Merriman, K.E., Kweh, M.F., Powell, J.L., Lippolis, J.D., Nelson, C.D. Multiple  $\beta$ -defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2015. 154, 120–129.

Merriman, K.E., Poindexter, M.B., Kweh, M.F., Santos, J.E.P., Nelson, C.D. Intramammary 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> treatment increases expression of host-defense genes in mammary immune cells of lactating dairy cattle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2017. 173, 33–41.

Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C.J.M., Parsons, S.D.C., van Helden, P.D., Zinsstag, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis* - induced tuberculosis in humans. *Emerg. Infect. Dis*. 2013. 19, 899–908.

Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Beitz, D.C., Lippolis, J.D. In Vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *PLoS One*. 2010. 5, e15469.

Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Thacker, T.C., Beitz, D.C., Lippolis, J.D. Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) in bovine monocytes. *J. Dairy Sci.* 2010. 93, 1041–1049.

Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., Sacco, R.E., Nonnecke, B.J. Vitamin D signaling in the bovine immune system: A model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients.* 2012. 4, 181–196.

Nelson, C.D., Nonnecke, B.J., Reinhardt, T.A., Waters, W.R., Beitz, D.C., Lippolis, J.D. Regulation of *Mycobacterium*-specific mononuclear cell responses by 25-hydroxyvitamin D3. *PLoS One.* 2011. 6, e21674.

Nozaki, Y., Hasegawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, I., Shimokata, K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1997. 65, 3644–3647.

Qureshi, T., Templeton, J.W., Adams, L.G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet.Immunol. Immunopathol.* 1996. 50, 55–65.

Rhodes, S.G., Terry, L.A., Hope, J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M. 1, 25-Dihydroxyvitamin D 3 and Development of Tuberculosis in Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003. 10, 1129–1135.

Sonawane, A., Santos, J.C., Mishra, B.B., Jena, P., Progida, C., Sorensen, O.E., Gallo, R., Appelberg, R., Griffiths, G. Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2011. 13, 1601–1617.

Ströhle, A., Wolters, M., Hahn, A. Micronutrients at the Interface Between Inflammation and Infection - Ascorbic Acid and Calciferol. Part 2: Calciferol and the Significance of Nutrient Supplements. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2011. 10, 64–74.

Talat, N., Perry, S., Parsonnet, J., Dawood, G., Hussain, R. Vitamin D deficiency and tuberculosis progression. *Emerg. Infect. Dis*. 2010. 16, 853–855.

Van Rhijn, I., Godfroid, J., Michel, A., Rutten, V. Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models. *Microbes Infect*. 2008. 10, 711–715.

Verway, M., Bouttier, M., Wang, T.T., Carrier, M., Calderon, M., An, B.S., Devemy, E., McIntosh, F., Divangahi, M., Behr, M.A., White, J.H. Vitamin D Induces Interleukin-1 $\beta$  Expression: Paracrine Macrophage Epithelial Signaling Controls *M. tuberculosis* Infection. *PLoS Pathog*. 2013. 9, e1003407.

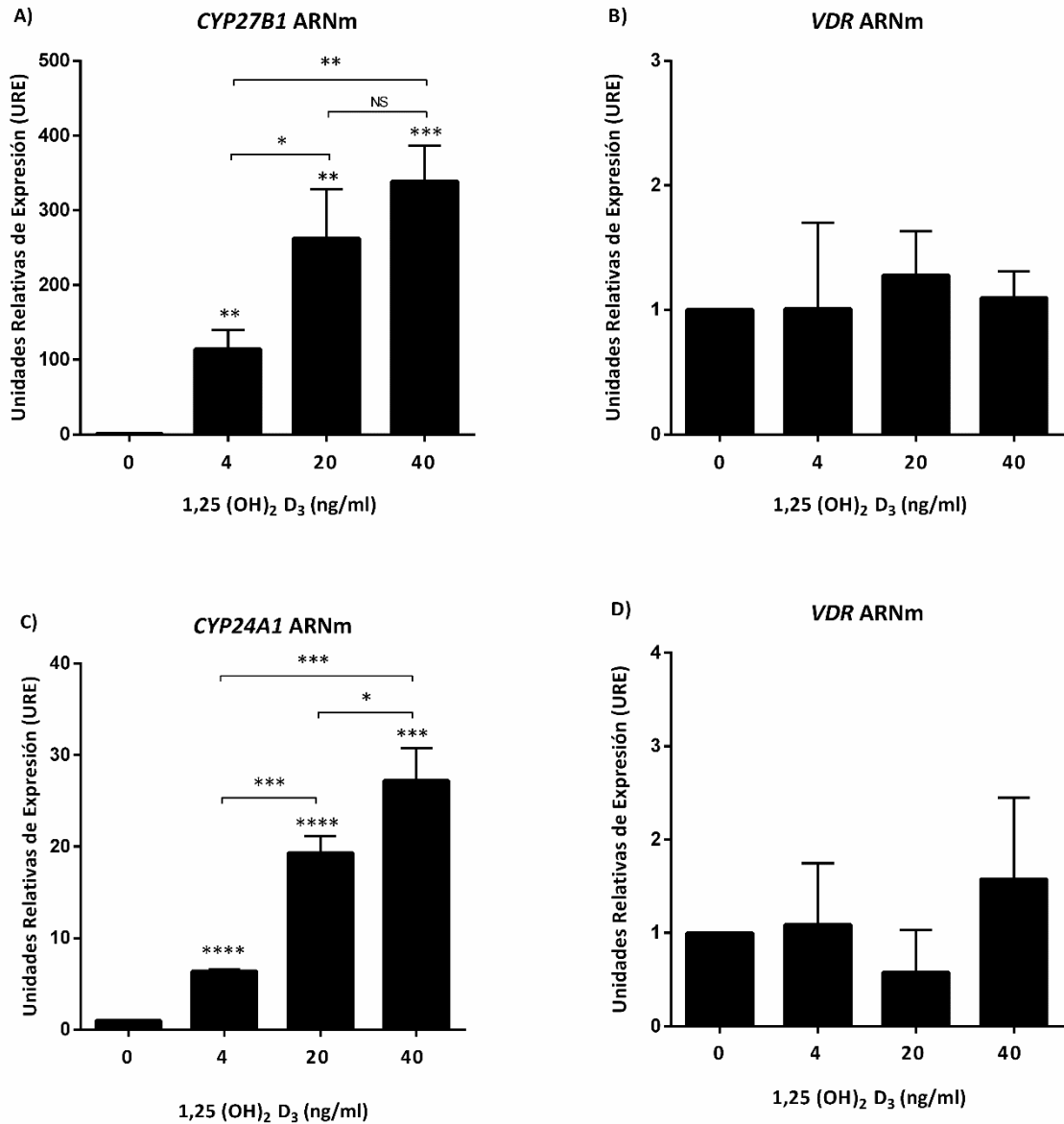
Wang, T.-T., Nestel, F.P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J.W., Mader, S., White, J.H. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J. Immunol*. 2004. 173, 2909–2912.

Waters, W.R., Nonnecke, B.J., Rahner, T.E., Palmer, M.V., Whipple, D.L., Horst, R.L. Modulation of *Mycobacterium bovis*-Specific Responses of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells by 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001. 8, 1204–1212.

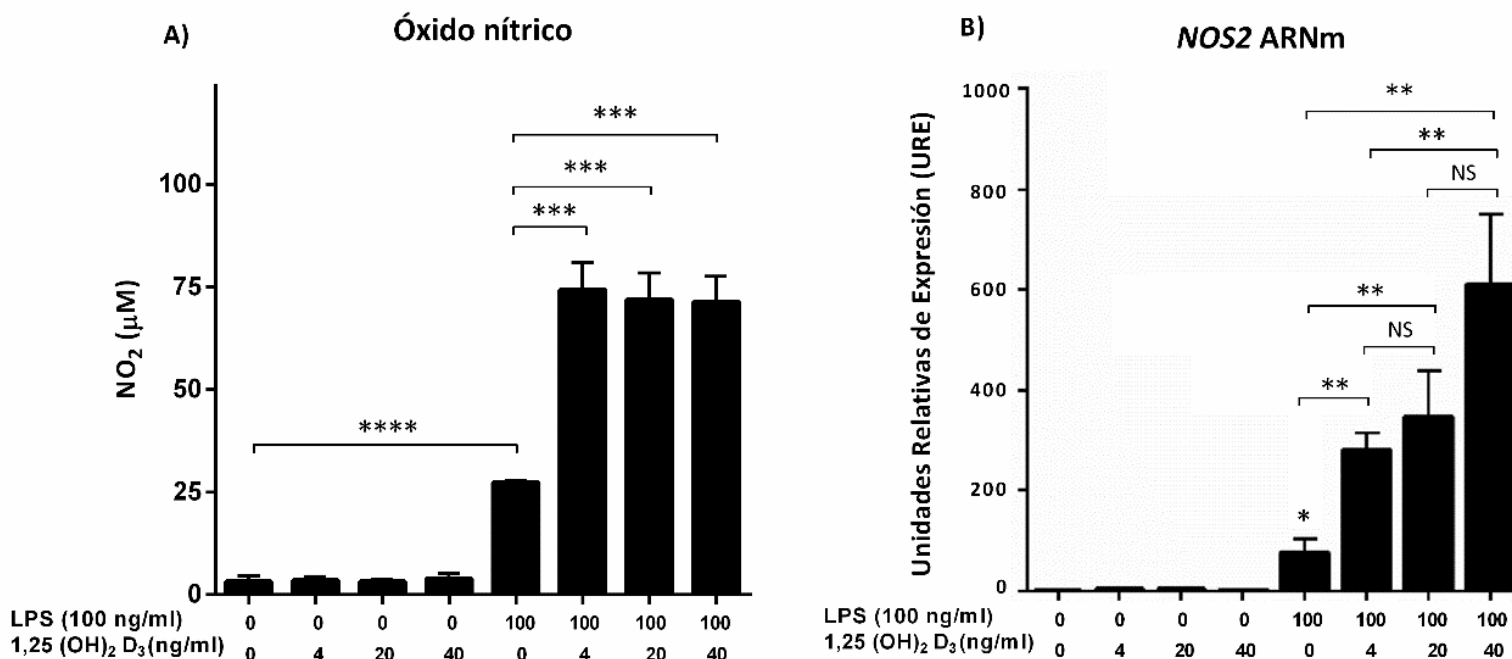
Waters, W.R., Palmer, M. V., Thacker, T.C., Davis, W.C., Sreevatsan, S., Coussens, P., Meade, K.G., Hope, J.C., Estes, D.M. Tuberculosis immunity: Opportunities from studies with cattle. *Clin. Dev. Immunol.* 2011.

Zhang, R., Naughton, D.P. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutr. J.* 2010. 9, 65.

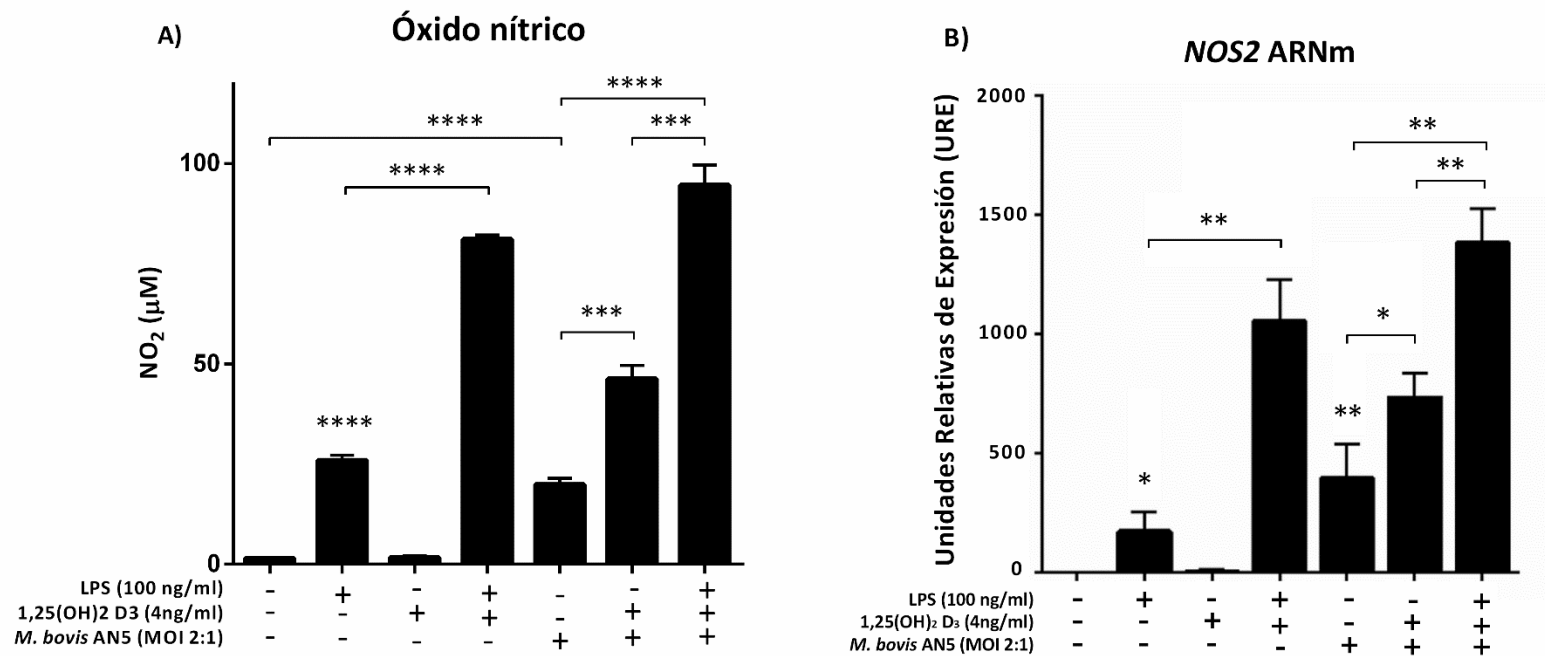
## FIGURAS



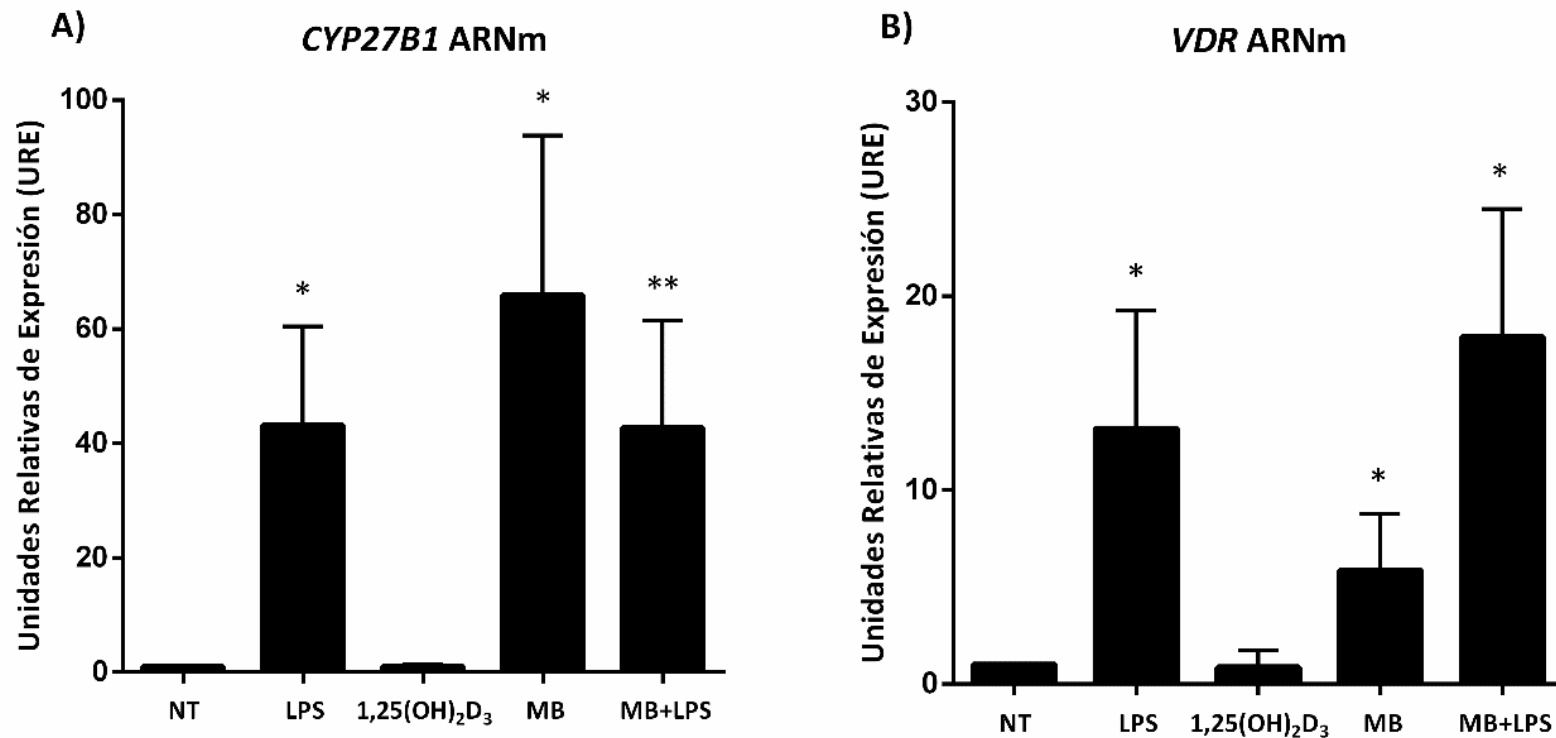
**Figura 1. Expresión génica de *CYP24A1* y *VDR* en macrófagos bovinos y CMSPB estimulados con calcitriol.** Se trataron un total de  $5 \times 10^5$  macrófagos bovinos y  $15 \times 10^6$  CMSPB con la concentración indicada de calcitriol durante 24 horas. La expresión génica de *CYP24A1* (A y C); *VDR* (B y D) se determinó mediante PCR en Tiempo Real. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos: \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ , NS, no significativo.



**Figura 2. Producción de óxido nítrico y expresión del gen NOS2 en macrófagos bovinos activados y estimulados con calcitriol.** Se incubaron un total de  $5 \times 10^5$  macrófagos bovinos con las concentraciones indicadas de LPS y calcitriol. El óxido nítrico se determinó midiendo los nitritos de los sobrenadantes de cultivo celular usando el ensayo de Griess (A); mientras que la expresión del gen NOS2 se determinó mediante PCR Tiempo Real (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes, con asteriscos que representan diferencias estadísticamente significativas. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ , NS, no significativo.

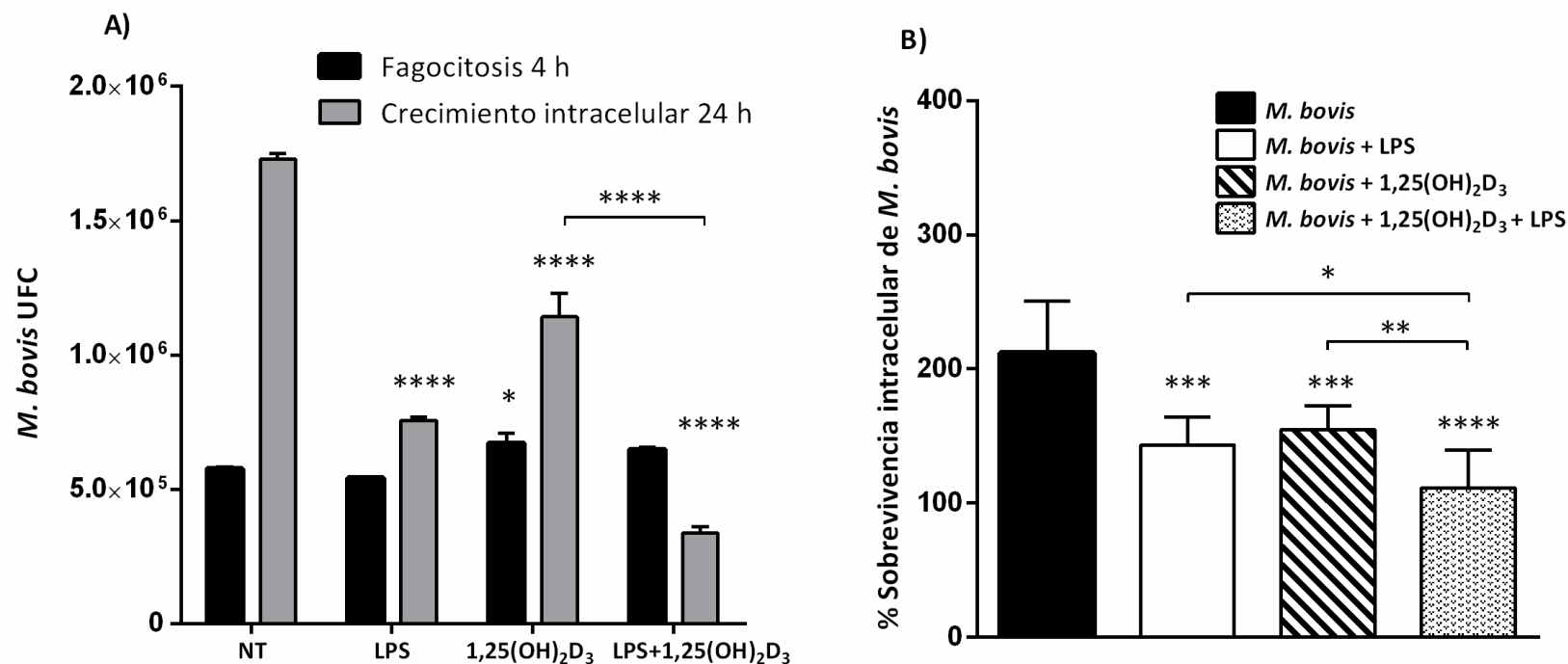


**Figura 3. Producción de óxido nítrico y expresión del gen NOS2 en macrófagos bovinos infectados por *M. bovis* y estimulados con calcitriol.** Se trataron un total de  $5 \times 10^5$  macrófagos bovinos con 100 ng/ml de LPS y 4 ng/ml de calcitriol, y se infectaron con *M. bovis* AN5 a una MOI de 2: 1 durante 24 horas. (A) El óxido nítrico se determinó midiendo nitritos en sobrenadantes de cultivo celular usando el ensayo de Griess. (B) La expresión de NOS2 se determinó mediante PCR Tiempo Real. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ .



**Figura 4. Expresión génica de *CYP27B1* y *VDR* en macrófagos bovinos infectados por *M. bovis*.** Se estimularon un total de  $5 \times 10^5$  macrófagos bovinos por pocillo con 100 ng/ml de LPS, se trataron con 4 ng / ml de calcitriol y se infectaron con *M. bovis* AN5 a una MOI de 2: 1 durante 24 horas. La expresión génica de *CYP27B1* (A) y *VDR* (B) es relativa a los macrófagos no tratados, NT; MB; *M. bovis*; MB + LPS, *M. bovis* + LPS. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes, con asteriscos que representan diferencias estadísticamente significativas. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ .





**Figura 5. Inmunomodulación por calcitriol en la actividad antibacteriana contra *M. bovis* en macrófagos bovinos.** Se usaron un total de  $5 \times 10^4$  macrófagos bovinos, que se trataron con 100 ng/ml de LPS, se estimularon con 4 ng/ml de calcitriol, y se infectaron con *M. bovis* AN5 a una MOI de 20: 1 por 4 horas, y luego se lavaron y se cultivaron nuevamente durante 24 horas con los tratamientos correspondientes. (A) Las bacterias fagocitadas y el recuento de supervivencia intracelular se determinaron mediante el ensayo UFC. (B) El crecimiento intracelular bacteriano se calculó por la relación de micobacterias fagocitadas a las 4 horas con las que sobrevivieron 24 horas después de la infección y se expresa en porcentaje (%). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ .