



Asesorías y Tutorías para la Investigación Científica en la Educación Puig-Salabarría S.C.
José María Pino Suárez 400-2 esq a Lerdo de Tejada, Toluca, Estado de México. 7223898475
 RFC: ATI120618V12

Revista Dilemas Contemporáneos: Educación, Política y Valores.

<http://www.dilemascontemporaneoseduccionpoliticaayvalores.com/>

Año: X Número: 2. Artículo no.:94 Período: 1ro de enero al 30 de abril del 2023.

TÍTULO: Estandarizar el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de memoria para evaluar el efecto mediado por 1,25 (OH)₂ Vitamina D₃ mediante el análisis de factores transcripcionales y producción de citoquinas.

AUTORES:

1. Máster. Faryd Javier Llerena Toro.
2. Máster. Rober Ramón Ormaza Cevallos.
3. Máster. Lisseth Estefanía Artieda Moreno.
4. Esp. Danilo Adrián Navarrete Sornoza.

RESUMEN: El objetivo del estudio es estandarizar el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de memoria para evaluar el efecto mediado por 1,25 (OH)₂ Vitamina D₃. Para llevar a cabo esta investigación, se extrajeron linfocitos T helper de memoria de sangre periférica y se activaron con anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de Vitamina D. Se determinaron los cambios en la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ de memoria, analizando la expresión de factores de transcripción y la producción de citoquinas por citometría de flujo. Los resultados demostraron los cambios que se producen sobre la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ de memoria en cuanto a los perfiles de producción de citoquinas. En conclusión, los linfocitos T CD4⁺ en presencia a la Vitamina D modula diversos procesos.

PALABRAS CLAVES: vitamina D, CD4⁺, aislamiento, cultivo.

TITLE: To standardize the isolation of memory CD4⁺ T lymphocytes to assess the effect mediated by 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ by analysis of transcriptional factors and cytokine production.

AUTHORS:

1. Master. Faryd Javier Llerena Toro.
2. Master. Rober Ramón Ormaza Cevallos.
3. Master. Lisseth Estefanía Artieda Moreno.
4. Spec. Danilo Adrián Navarrete Sornoza.

ABSTRACT: The objective of the study is to standardize the isolation of memory CD4⁺ T lymphocytes to evaluate the effect mediated by 1,25 (OH)₂ Vitamin D₃. To carry out this investigation, memory T helper lymphocytes were extracted from peripheral blood and activated with anti-CD3/CD28 in the presence or absence of Vitamin D. Changes in the differentiation of memory CD4⁺ T lymphocytes were determined, analyzing the expression of transcription factors and the production of cytokines by flow cytometry. The results demonstrated the changes that occur on the differentiation of memory CD4⁺ T lymphocytes in terms of cytokine production profiles. In conclusion, CD4⁺ T lymphocytes in the presence of Vitamin D modulate various processes.

KEY WORDS: vitamin D, CD4⁺, isolated, crop.

INTRODUCCIÓN.

Vitamina D.

El término Vitamina D se refiere a dos compuestos químicos, que se denominan ergosterol o Vitamina D₂, y colecalciferol o Vitamina D₃ (Bivona, Agnello, & Ciaccio, 2017). Tanto la Vitamina D₂ como D₃, se pueden obtener por dos fuentes, la dieta y la radiación ultravioleta B (UVB, 290-320 nm), para luego entrar en circulación y ejercer su función fisiológica (Heaney, 2008). Esta Vitamina es de naturaleza liposoluble y se considera precursora de una importante hormona esteroide que sufre

cambios metabólicos, basado en dos hidroxilaciones, una en el hígado y luego en los riñones, para dar como resultado el metabolito fisiológicamente activo que se va a unir al receptor de la Vitamina D (VDR) para permitir sus diversas funciones (Jeon & Shin, 2018). Las dos formas fisiológicamente relevantes en circulación son la 25 (OH) D₃ o calcidiol, que es la principal forma circulante de la Vitamina D, y la 1,25 (OH)₂ D₃ o calcitriol, que es el metabolito fisiológicamente activo (Medrano, Carrillo-Cruz, Montero, & Perez-Simon, 2018).

La principal acción de la Vitamina D está dada por la participación en el metabolismo del calcio y el fósforo; por lo tanto, ayuda en la regulación ósea; recientemente, otras funciones se han visto asociadas a la modulación por Vitamina D incluyendo la regulación del sistema inmune, inhibiendo la proliferación y diferenciación celular, además de su acción efectora de tipo proinflamatoria.

Metabolismo de la Vitamina D.

La Vitamina D es sintetizada en la piel a partir de la 7-dehidrocolesterol (7-DHC) a través de un proceso de dos pasos en el que el anillo B se rompe por la luz UV del sol, formando pre-D₃, la cual se isomeriza a D₃ en un proceso termosensible (Bikle, 2014). Posteriormente, la Vitamina D₃ entrará en circulación mediante la proteína de unión de la Vitamina D (VDPB) y será transportada hasta el hígado, mientras que la Vitamina obtenida por la dieta se absorberá en el intestino delgado y se transportará al hígado a través de quilomicrones y VDPB (Boland et al. 2003).

En el hígado, la Vitamina D sufre la primera hidroxilación antes de ejercer sus funciones fisiológicas, por la acción de la enzima CYP27A1 para producir 25 (OH) D₃ o calcidiol, mientras que la segunda hidroxilación ocurrirá en los riñones, específicamente en los túbulos renales, por la enzima CYP27B1, dando lugar a la 1,25 (OH)₂ D₃ o calcitriol, el metabolito fisiológicamente activo (Landel, Annweiler, Millet, Morello, & Feron, 2016) (Ilustración 1).

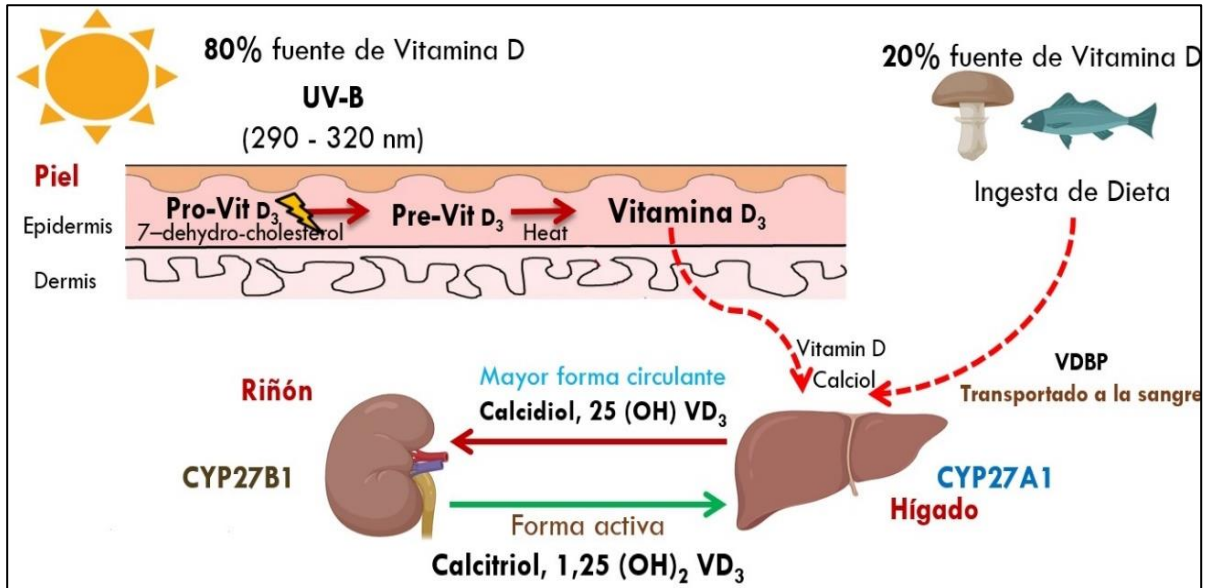


Ilustración 1. Metabolismo de la Vitamina D.

Las principales isoformas de la Vitamina D son dos: Vitamina D2 (ergocalciferol) y Vitamina D3 (colecalciferol). La primera se sintetiza a partir del ergosterol por radiación UVB y esta puede ingerirse en una dieta. Luego, la Vitamina D3 se sintetiza a partir del 7-deshidrocolesterol por la radiación UVB en la epidermis de la piel. Ambas isoformas que se originan en la piel o dieta entran en circulación uniéndose a la proteína de unión de la Vitamina D (VDBP) (Jeon & Shin, 2018).

Mecanismo de acción de la Vitamina D.

El metabolito fisiológicamente activo de la Vitamina D ejerce una respuesta sobre las distintas células y tejidos al unirse al receptor de Vitamina D (VDR), que es un factor de transcripción que se heterodimeriza con el receptor retinoide X (RXR), generando un complejo de transducción de señal activo, que se translocará al núcleo donde se unirá a elementos de respuesta de la Vitamina D (VDRE). Una vez que el dímero RXR-VDR se une a las regiones promotoras de los genes sensibles a la Vitamina, éste ejerce una acción co-activadora o co-represora en las distintas células diana, como ejemplo, las células del sistema inmune (Aranow, 2011; Haussler, Jurutka, Mizwicki, & Norman, 2011).

El papel de la Vitamina D en el sistema inmune se ha estudiado en la última década, ya que ejerce un efecto modulador apoyado por el (VDR) en las células del sistema inmune innato y adaptativo, incluido los macrófagos, células dendríticas, células B y células T (Azrielant & Shoenfeld, 2017) (Ilustración 2).

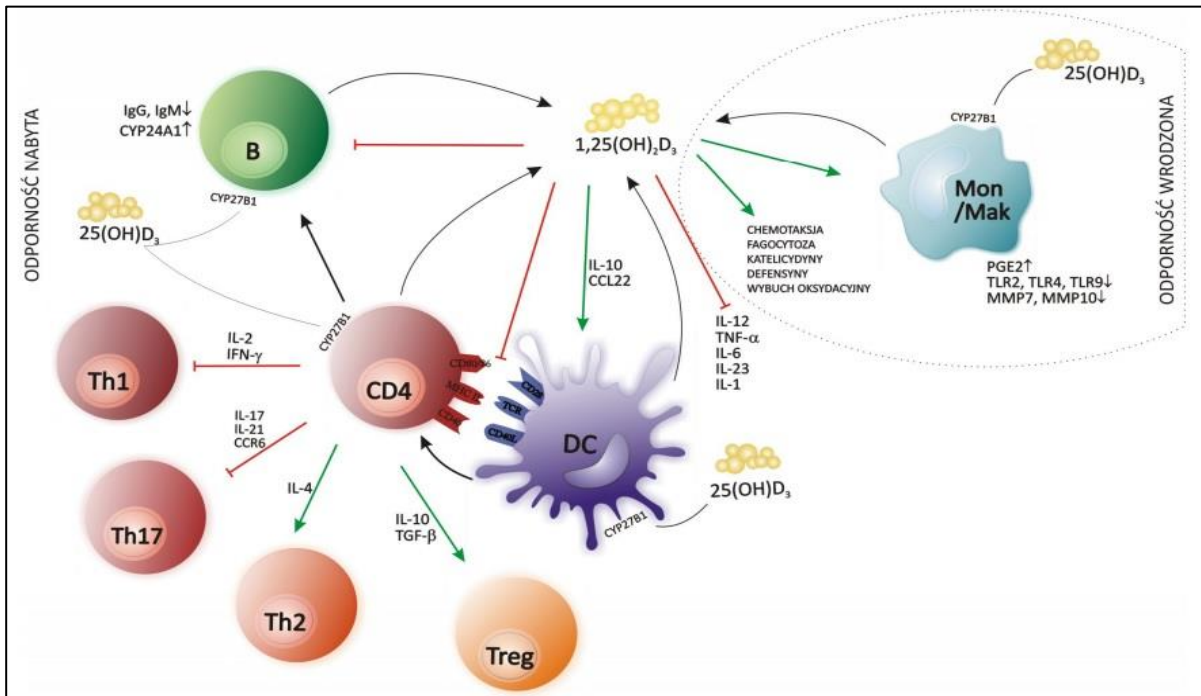


Ilustración 2. Vitamina D y el Sistema Inmunitario.

El metabolito fisiológicamente activo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la respuesta innata, mejorando así sus funciones específicamente en los macrófagos, ya que le proporciona propiedades quimiotácticas y fagocíticas. Inhibe la maduración y diferenciación de las células dendríticas. En las células T ocurre una menor diferenciación de los linfocitos Th1 y Th17, debido a la reducción en la secreción de citoquinas involucradas en su diferenciación, y al mismo tiempo, promueve la diferenciación a células del fenotipo tipo Th2 e induce un desarrollo de células reguladoras directa e indirectamente a través de la acción de las células dendríticas. También produce una reducción en la producción de anticuerpos de tipo IgG e IgM por las células plasmáticas (Myszka & Klinger, 2014).

Vitamina D y el Sistema Inmune.

La Vitamina D regula la proliferación y diferenciación celular, y además juega un papel clave en las respuestas del sistema inmune y nervioso. De hecho, varios estudios sugieren que las altas concentraciones séricas de Vitamina D protegen contra enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer. La evidencia de mecanismos de acción de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que apoye la protección del organismo incluye desintoxicación xenobiótico, reducción del estrés oxidativo, funciones neuroprotectoras, defensa contra agentes patógenos e inmunoregulación. Esto debido a que el VDR está presente en varios tejidos como los queratinocitos, pro-mielocitos, monocitos, linfocitos, células ováricas, células de los islotes pancreáticos, entre otras (Gil, Plaza, & Mesa, 2018).

Dentro del sistema inmune, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ejerce diversas funciones en las células de inmunidad innata, ya que mejora las respuestas quimiotácticas y fagocíticas de los macrófagos, y regulando la respuesta adaptativa a nivel de las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas, ya que inhibe la expresión del complejo MHC-II y de moléculas co-estimuladoras, además de la producción de citoquinas que desplazan a las células T helper (Th) a un fenotipo Th2 y Treg, e inhibiendo Th1 y Th17. Finalmente, la Vitamina D bloquea la diferenciación de células plasmáticas, la producción de anticuerpos de tipo IgG e IgM y la proliferación de células B (Baeke, Takiishi, Korf, Gysemans, & Mathieu, 2010).

La Vitamina D, además de ser metabolizada en el hígado y los riñones, puede ser metabolizada por las células del sistema inmune, ya que estas células expresan las enzimas CYP27A1 y CYP27B1. De esta manera, el metabolito fisiológicamente activo se puede concentrar en puntos específicos donde exista una alta concentración de Vitamina D_3 , lo que aumenta su acción específica en las células (Mora, Iwata, & von Andrian, 2008).

Vitamina D y células T helper.

La Vitamina D ejerce su función inmunomoduladora en las células T activadas, mediante la estimulación del receptor de células T (TCR), que lleva a un aumento en la expresión del VDR (Joseph et al., 2012). Además, las células T expresan bajos niveles de CYP27B1 en estado basal, pero esta expresión aumenta significativamente al potenciar su activación con estimuladores anti-CD3 / anti-CD28 (Ilustración 3).

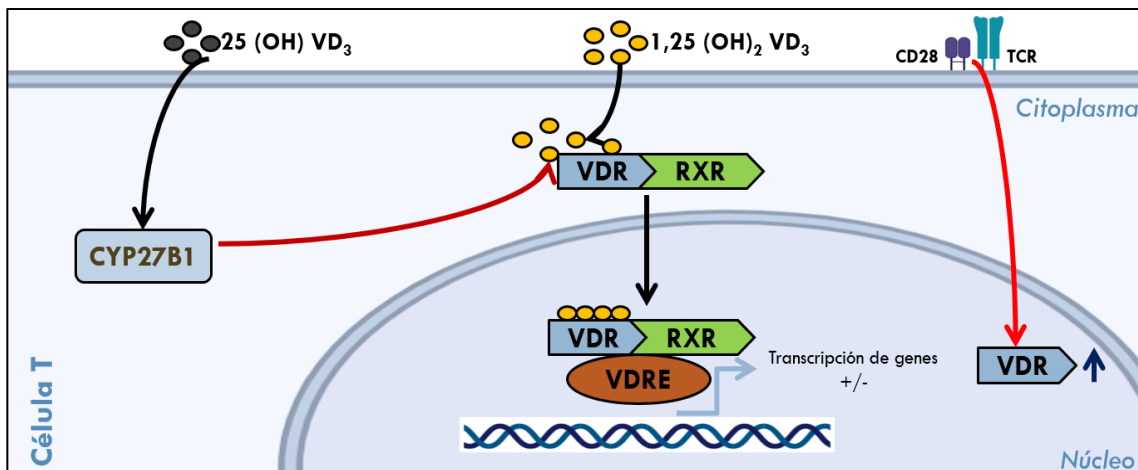


Ilustración 3 Receptor de la Vitamina D y señalización en células T.

Esos cambios muestran, que la Vitamina D conduce a una inhibición de la proliferación y diferenciación de células Th1, las cuales se caracterizan por la expresión de su factor de transcripción específico Tbet, reduciendo la expresión de IL-2, Interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Por otra parte, se estimula la diferenciación de células Th2, las cuales se caracterizan por la expresión de su factor de transcripción específico GATA-3, con la expresión de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13. También se ha visto que la Vitamina D inhibe células Th17, caracterizadas con su factor de transcripción ROR, disminuyendo la expresión de IL-17 e IL-22 y potencia la diferenciación de células T reguladoras, promoviendo la expresión de su factor de transcripción FoxP3 y la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Skrobot, Demkow, & Wachowska, 2018) (Tabla 1).

Durante la respuesta inmune, el TCR se activa por antígenos específicos, lo que induce diversos estímulos que conducen a una señalización intracelular; esta activación también promueve la expresión de la enzima de síntesis 1,25 (OH)₂ VD₃, que se unirá al VDR y la enzima CYP27B1 que posteriormente se transformará en el metabolito activo. El VDR se activa y se transloca al núcleo donde inducirá la transcripción de genes tanto positiva como negativamente (Kongsbak, Levring, Geisler, & Von Essen, 2013).

Tabla 1. Perfiles de diferenciación de linfocitos T CD4.

Células CD4 ⁺	Factor de Transcripción	Citoquinas
Th1	Tbet	IL-2, IFN- γ , TNF- α
Th2	GATA-3	IL-4, IL-5 e IL-13
Th17	ROR α β	IL-17
Treg	FoxP3	IL-10

Efecto de la Vitamina D sobre linfocitos T CD4.

En trabajos previos, se han demostrado, que los linfocitos en reposo no contienen VDR; sin embargo, la activación *in vitro* de linfocitos con mitógenos causa la expresión del VDR. Los linfocitos T humanos requieren exposición a un activador antes de responder a 1,25 (OH)₂ D₃ (Veldman, Cantorna, & DeLuca, 2000).

Trabajos previos has evaluado el efecto de la Vitamina D en células T y sus subpoblaciones a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y los resultados indicaron, que al activar estas células con anticuerpos anti-CD3-CD28 y estimularlas en presencia de Vitamina D, se induce una expresión del VDR e inhibe IL-2, IFN- γ e IL-17, además induce un aumento en la producción de IL-4 y aumento en el desarrollo de células T reguladoras por la expresión de FOXP3 e IL-10. Se observó además, que ésta también induce la producción de CYP27B1, lo que evidencia que estas células

también pueden producir localmente el metabolito fisiológicamente activo de la Vitamina D (Margherita et al. 2015).

En otro estudio, se demostró que la Vitamina D afecta el equilibrio Th1 y Th2, ya que inhibe células Th1 y aumenta el desarrollo de las células Th2. Estos aumentos en el desarrollo de Th2 se correlacionó con el aumento de la expresión de citoquinas y factores transcripcionales específicos como GATA-3 (Boonstra et al., 2001).

Un análisis de microarrays en células Th identificó una serie de genes que tenían vínculos con la regulación de la función inmune. Dos genes de quimiocinas fueron reprimidos por la estimulación con la Vitamina D en las células Th (citoquina pequeña inducible A21b o CCL21 y receptor de quimiocina XC 1 o linfotactina), ambos genes son importantes en la inflamación y migración de células T. Además, dos genes que regulan el factor de transcripción NFKB, fueron regulados positivamente en células Th1 y Th2 con Vitamina D. Estos genes son importantes, ya que son cruciales en la expresión génica durante las respuestas inmunes e inflamatorias. Estos genes parecen ser clave para comprender la regulación de la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ en la función inmunoreguladora (Mahon, Wittke, Weaver, & Cantorna, 2003; Marsland et al., 2005; Szymczak & Pawliczak, 2016).

Se ha observado, que $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ puede tener efectos directos e indirectos en las distintas subpoblaciones de linfocitos Th; algunos estudios han demostrado que la diferenciación, secreción de citoquinas, y progresión del ciclo celular, son inhibidas por acción de la Vitamina D específicamente en algunos linajes considerados proinflamatorios, mientras que favorece la proliferación y polarización hacia linajes de carácter antiinflamatorio.

DESARROLLO.

Materiales y métodos.

Criterios.

Se tomaron en cuenta solo a pacientes sanos, mientras que los criterios de exclusión incluyeron enfermedades concomitantes agudas y crónicas graves que afectaran en el resultado final.

Recolección de muestra.

Mediante punción venosa se obtuvieron aproximadamente 50mL de sangre periférica en tubos que contenían anticoagulante EDTA.

Células mononucleares de sangre periférica.

El total de sangre obtenida se diluyó con solución salina tamponada con fosfato (PBS-1X) a una relación 1:1 y mediante el uso de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) a una densidad de 1.077g/ml, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica.

Selección negativa.

Las células T CD4 de memoria se obtuvieron por selección negativa mediante el uso del Kit de aislamiento de células T CD4 de memoria humano (Miltenyi Biotec), el cual marca las células naive y Linfocitos T CD4- con anticuerpos biotinilados CD45RA, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD36, CD123, anti-TCR γ/δ , y CD235a (Glicoforina A), en conjunto con microbeads acoplados a anticuerpos antibiotina. A continuación, el pool de células se sometió a una fuerte atracción magnética; de esta manera, los complejos microbeads-células fueron retenidos por la columna; por lo tanto, la fracción no unida a la columna correspondió a las células T CD4⁺ de memoria.

Sorting.

Las células T CD4⁺ de memoria se incubaron posteriormente con anticuerpos anti-CD4 (FITC), anti-CD25 (PECY7), anti-CD127 (PERCP Cy 5.5) y anti-CD45RA (APCCy7) por 30 minutos a 4°C. Estas células T CD4⁺ de memoria se sortearon utilizando el sorter ARIA (BD).

Condiciones de cultivo.

Una vez obtenidos los linfocitos T CD4⁺ de memoria, se procedió a realizar el montaje en placa de 96 pocillos en fondo de “U”. Por condición, se estimó 200.000 células en 100µl de medio de cultivo X-vivo (Lonza), previa activación de estas células con anticuerpos anti CD3/CD28 adheridos a beads magnéticos (Miltenyi Dynabeads) en relación 1:4 (1 bead magnético por cada 4 células).

Posteriormente, se agregó 100µl de solución Vitamina D 20 nM, llegando así a un volumen final de 200µL con una concentración de 10nM de Vitamina D. Para la segunda condición se agregó 100µl de una solución en medio de cultivo, sustituyendo el volumen de Vitamina D detallado en la condición anterior por etanol absoluto. Se incubó a 35-37 °C en atmósfera 5% CO₂ por 6horas, 12 horas, 24 horas, 3 días y 5 días. Estas células fueron utilizadas para medir factores transcripcionales y el sobrenadante se usó para medir citoquinas.

Factores de transcripción.

Para la identificación de factores transcripcionales, se realizó fijación y permeabilización de las muestras, utilizando Kit de FoxP3 (FoxP3 Kit, eBiosciences), la cual permitió identificar FOXP3, GATA3, TBET y ROR- γ (BioLegend). Las muestras fueron adquiridas por citometría de flujo utilizando LSR-Fortessa (BD) y analizadas con el programa FlowJo.

Cuantificación de citoquinas (CBA).

Se utilizó el kit de citoquinas humanas Th1/Th2/Th17 (BD), la cual puede ser utilizada para medir Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), Interferón- γ (IFN- γ) e Interleucina-17A (IL-17A) en una sola muestra, el cual se basa en la utilización de beads conjugados con anticuerpos y el reactivo detector está conjugado con ficoeritrina (PE), en donde se forman complejos sándwich (bead de captura + analito + reactivo de detección), permitiendo detectar los analitos por citometría de Flujo.

Resultados.

Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de memoria desde sangre periférica.

Para aislar células T CD4⁺ de memoria se emplearon dos metodologías, (Figura 1A), con el fin de obtener una población de alta pureza. Los resultados mostraron que dentro de las PBMCs se encuentra un 20% de linfocitos T CD4⁺ de memoria, los cuales aumentaron su pureza casi 4,5 veces más con las técnicas de separación de células por cell sorting con y sin pre-tratamiento con beads magnéticos. Si bien la separación por beads magnéticos permitió una población con un 93% de pureza, se determinó que las células sorteadas presentaron mayor porcentaje de pureza llegando a un 100% (Figura 1B).

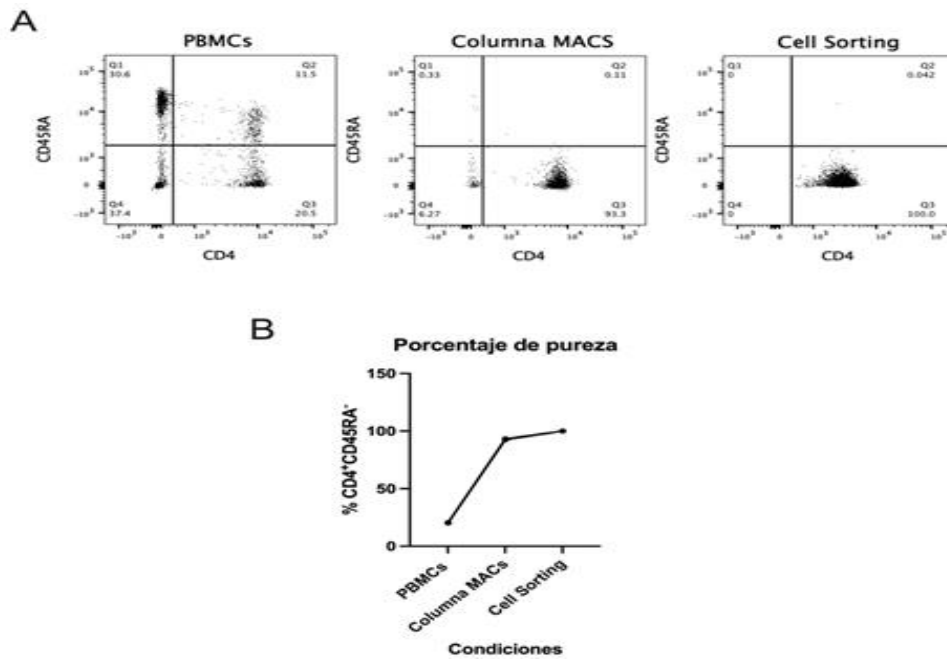


Figura 1. Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de memoria desde sangre periférica.

A) Dot plots representativos de la pureza de linfocitos CD4⁺ de memoria posterior a la metodología utilizada para el aislamiento por columna con beads magnéticos y cell sorting, se utilizó marcador CD4 para identificar a toda la población T helper y el marcador CD45RA para identificar células naive.

B) Porcentaje de linfocitos CD4⁺CD45RA⁻ previo aislamiento en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y posterior a aislamiento secuencial por columna y cell sorting.

Vitamina D incrementa el recuento celular en linfocitos T CD4⁺ de memoria.

Una vez obtenido los linfocitos T CD4⁺ de memoria, estos fueron activados con anti-CD3/CD28 para o ser sembradas en cantidad de 200.000 células por pocillo y estimularlas con Vitamina D a una

concentración de (10nM), a distintos tiempos 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 días y 5 días. Además, las células se conjugaron con reactivo Live/Dead y bead de conteo para determinar la viabilidad y el recuento celular.

Los resultados del recuento celular muestran que existen diferencias significativas en cuanto a un mayor número de células en presencia de Vitamina D con respecto a su control al día 5 (Figura-2A). Además, a los distintos tiempos empleados se observa que el número de células vivas tiende a aumentar en presencia de Vitamina D al día 5, lo que en parte explica que estos linfocitos T CD4⁺ son funcionales en base a ejercer actividad y producir múltiples citoquinas (Figura-2A). Debido a la variabilidad de los 3 donantes observada en la Figura 2A, se repitió el experimento con 7 donantes y analizamos el recuento celular solo al día 5, observando que en todos los donantes existe un aumento significativo del recuento celular en presencia de Vitamina D (Figura 2B).

Una vez determinado que la Vitamina D no afecta el recuento celular negativamente, las células fueron caracterizadas para medir factores de transcripción, mientras que el sobrenadante fue utilizado para medir citoquinas.

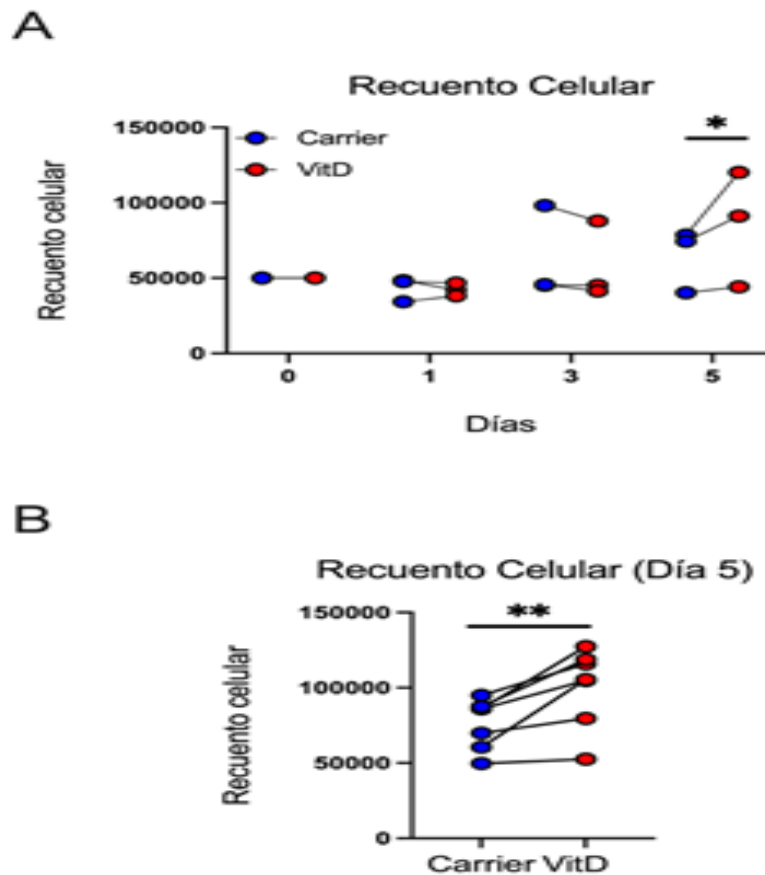


Figura 2. Recuento celular de linfocitos T CD4⁺ de memoria en presencia de Vitamina D.

A) Recuento celular de linfocitos T CD4⁺ de memoria (2x10⁵) Live/Dead- activados con anti-CD3/CD28 beads (Ratio1:5) en presencia o ausencia de vitamina D (10mM) al día 1, 3 y 5 post activación. * p<0,0320 utilizando un 2-way ANOVA-Sidak.

B) Recuento celular de linfocitos T CD4⁺ de memoria (2x10⁵) Live/Dead- activados con anti-CD3/CD28 beads (Ratio1:5) en presencia o ausencia de Vitamina D (10mM) al quinto día de cultivo. ** p<0,0064 utilizando un t test pareado.

Vitamina D promueve la expresión de citoquinas de linajes Th2 y Treg e inhibe citoquinas de linaje Th1 y Th17.

Una vez analizado el recuento, se evaluó la expresión de citoquinas *in vitro* en células T CD4⁺ de memoria en presencia o ausencia de Vitamina D, utilizando el mismo protocolo que se detalló para análisis de recuento. Para esto, se tomaron los sobrenadantes de las células cultivadas a los distintos

tiempos y se midieron las citoquinas por Cytokine bead array. No se observaron cambios significativos para ninguna citoquina 6, 12 y 24 horas post activación, a diferencia de los 3 y 5 días, lo que sugiere que la célula T debe estar activada con más de 24 horas para que la Vitamina D ejerza su efecto.

Al día 3 se observa una inducción de citoquinas Th2 tales como IL-4 e IL-6, citoquinas producidas por Treg como la IL-10 y se observa una inhibición significativa de IFN- γ . Luego, al día 5, se observa que hay un aumento de citoquinas Th2 tales como TNF- α e IFN- γ (Figura 3A). Los resultados muestran que la Vitamina D ejerce un efecto modulador a distintos tiempos, por lo que favorece a una diferenciación hacia un linaje tipo Th2 y Treg, mientras que por otro lado, la Vitamina D ejerce un efecto inhibitorio en cuanto a la expresión de citoquinas que difieren de un linaje tipo Th1.

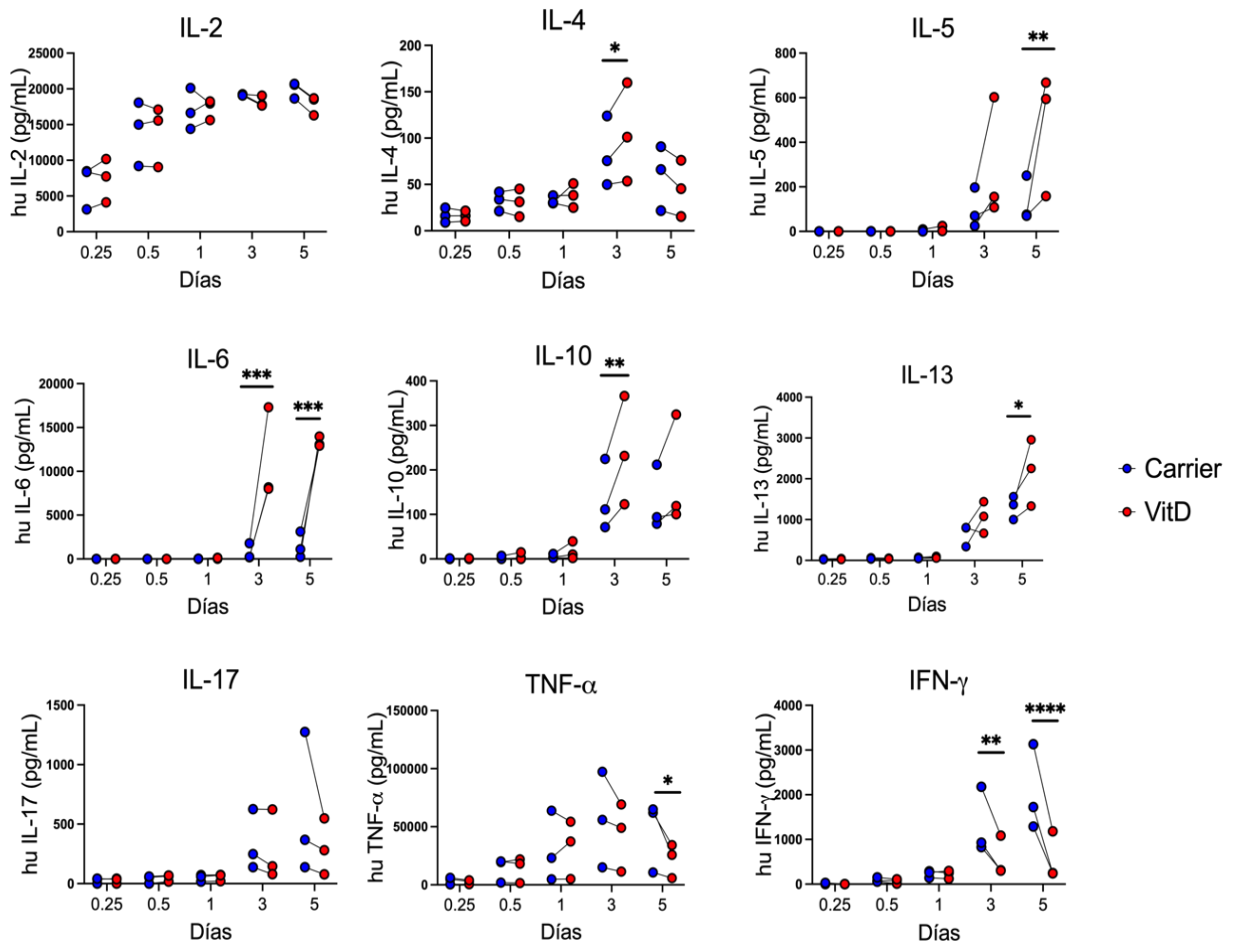


Figura 3. Caracterización del perfil de citoquinas de linfocitos T CD4⁺ de memoria en presencia de Vitamina D.

Producción de citoquinas de linfocitos T CD4⁺ de memoria (2x10⁵) activados con anti-CD3/CD28 beads (Ratio1:5) en presencia o ausencia de Vitamina D (10mM) a las 6h (0.25), 12h (0.5) y a los días 1, 3 y 5 post activación. Para IL-4 * p<0,0436, IL-5 ** p<0,0095, IL13 * p<0,0274, IL-10 ** p<0,0026, IFN- γ ** p<0,0018 **** p<0,0001 y TNF- α * p<0,0249 utilizando un Two way ANOVA-Sidak.

Vitamina D promueve la expresión de FOXP3 e inhibe la expresión de Tbet en linfocitos T CD4⁺ de memoria.

Una vez analizado los tiempos de secreción de las citoquinas de los distintos linajes, se analizó la expresión de los factores de transcripción en las células T CD4⁺ de memoria; para lo cual se tomaron las células entre el día 3 y 5 para ser fijadas y permeabilizadas, y posteriormente, analizar las muestras por citometría de flujo (Figura 4A). Los resultados muestran que la Vitamina D es capaz de inhibir significativamente la expresión del factor de transcripción de Th1-Tbet y aumentar la expresión del factor de transcripción de Treg-FOXP3 (Figura 4B).

Pese a que se observa una tendencia para los factores de transcripción de linajes Th17 y Th2, la diferencia entre la expresión de los factores de transcripción ROR- γ y GATA-3 no lograron significancia. Los resultados muestran que la Vitamina D modifica la expresión de los factores transcripcionales que llegan a diferenciar a los distintos linajes de linfocitos T helper, lo que se condice con los resultados mostrados anteriormente en la expresión de citoquinas.

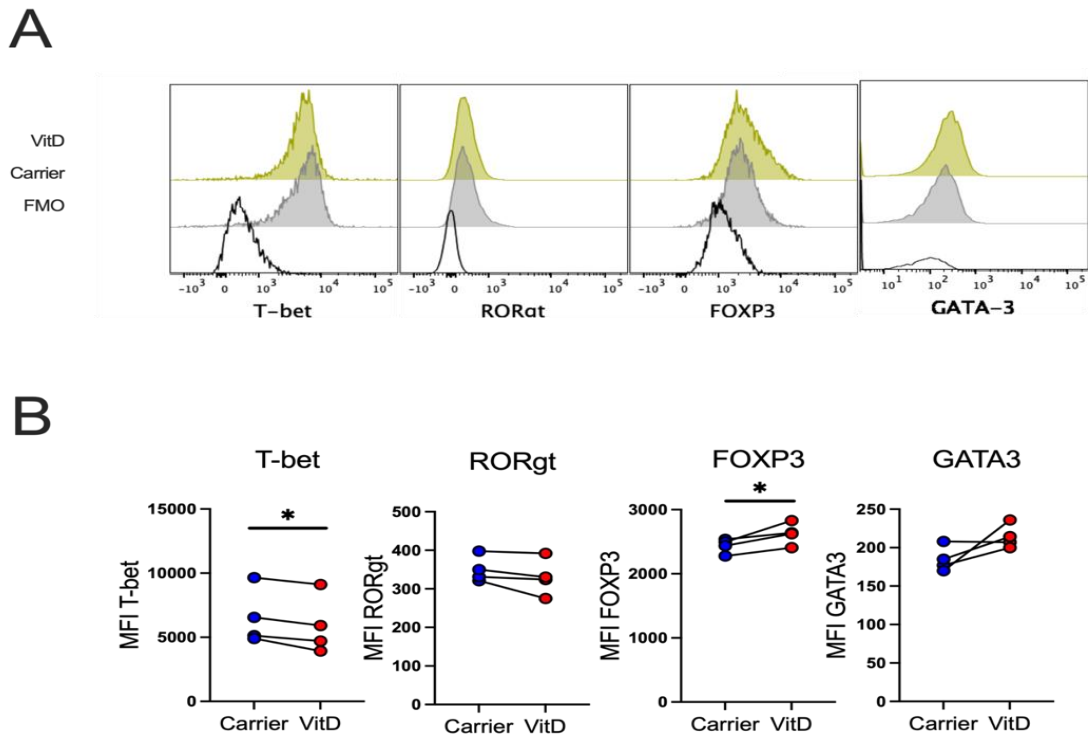


Figura 4. Caracterización de la expresión de los factores de transcripción de linfocitos T CD4+ de memoria en presencia de Vitamina D.

A) Dot plots representativos de la expresión de los factores de transcripción Tbet, ROR γ t, FOXP3 y GATA3 en linfocitos T CD4+ de memoria (2×10^5) activados con anti-CD3/CD28 beads (Ratio 1:5) en presencia o ausencia de Vitamina D (10mM) al día 5 post activación.

B) Intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de los factores de transcripción Tbet, ROR γ t, FOXP3 y GATA3. Para FOXP3 * $p < 0,0358$ y Tbet * $p < 0,0128$ utilizando un t test pareado.

Discusión.

La Vitamina D tiene funciones importantes más allá de participar en la homeostasis del calcio y remodelación ósea, que incluyen la modulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ es el metabolito activo de la Vitamina D, que ejerce un efecto multidireccional, ya que es responsable de incrementar actividad inmunitaria, diferenciación y producción de citoquinas. Este efecto se da gracias a que el VDR intracelular, determinado por la unión específica a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ se

expresa en los linfocitos T activados. Varios estudios sugieren que la Vitamina D puede aumentar la función de las Treg tanto en individuos sanos como en pacientes con trastornos autoinmunes; así mismo, se demostró que la Vitamina D afecta la diferenciación celular tipo Th1 y aumenta el desarrollo celular del tipo Th2, además, de la inhibición del linaje Th17.

Al evaluar la expresión de citoquinas, se observó que al día 3 y 5 existe una elevación en la expresión de citoquinas y factores de transcripción, indicando una diferenciación a un linaje tipo Th2 y Treg, resultados similares a los descrito en la literatura.

CONCLUSIONES.

Los resultados permiten avanzar en la búsqueda de mecanismos específicos asociados con la regulación de la viabilidad celular en la respuesta T helper en presencia de Vitamina D.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aranow, C. (2011). Vitamin D and the immune system. *Journal of investigative medicine*, 59(6), 881-886.
2. Azrielant, S., & Shoenfeld, Y. (2017). Vitamin D and the immune system. *Isr Med Assoc J*, 19(8), 510-511.
3. Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*, 10(4), 482-496.
4. Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & biology*, 21(3), 319-329.
5. Bivona, G., Agnello, L., & Ciaccio, M. (2017). Vitamin D and immunomodulation: is it time to change the reference values? *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 47(4), 508-510.
6. Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F., & O'Garra, A. (2001). $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4⁺ T cells to enhance the development of Th2 cells. *The Journal of Immunology*, 167(9), 4974-4980.

7. Margherita, T. C., Lindsay, S., Yang-Ding, L., & Linlin, Y. (2015). Vitamin D and 1, 25 (OH) 2D Regulation of T cells. *Nutrients*. Apr, 7(4), 3011-3021.
8. Gil Hernández, Á., Plaza Díaz, J., & Mesa García, M. D. (2018). Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr. Metab.*; 72(2), 87-95.
9. Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., & Norman, A. W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α , 25 (OH) 2vitamin D3: genomic and non-genomic mechanisms. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(4), 543-559.
10. Heaney, R. P. (2008). Vitamin D in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(5), 1535-1541.
11. Boland, R., Skliar, M., Curino, A., & Milanesi, L. (2003). Vitamin D compounds in plants. *Plant Science*, 164(3), 357-369.
12. Jeon, S. M., & Shin, E. (2018). Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Experimental & molecular medicine*, 50(4), 1-14.
13. Joseph, R. W., Bayraktar, U. D., Kim, T. K., St John, L. S., Popat, U., Khalili, J., . . . Komanduri, K. V. (2012). Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells. *Hum Immunol*, 73(7), 693-698.
14. Kongsbak, M., Levring, T. B., Geisler, C., & Von Essen, M. R. (2013). The vitamin d receptor and T cell function. *Frontiers in immunology*, 18(2013), 148.
15. Landel, V., Annweiler, C., Millet, P., Morello, M., & Féron, F. (2016). Vitamin D, cognition and Alzheimer's disease: the therapeutic benefit is in the D-tails. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53(2), 419-444.
16. Mahon, B. D., Wittke, A., Weaver, V., & Cantorna, M. T. (2003). The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *Journal of cellular biochemistry*, 89(5), 922-932.

17. Marsland, B. J., Bättig, P., Bauer, M., Ruedl, C., Lässing, U., Beerli, R. R., ... & Bachmann, M. F. (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*, 22(4), 493-505.
18. Medrano, M., Carrillo-Cruz, E., Montero, I., & Perez-Simon, J. A. (2018). Vitamin D: effect on haematopoiesis and immune system and clinical applications. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2663.
19. Mora, J. R., Iwata, M., & von Andrian, U. H. (2008). Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 8(9), 685-698.
20. Myszka, M., & Klinger, M. (2014). The immunomodulatory role of Vitamin D. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 68, 865-878.
21. Skrobot, A., Demkow, U., & Wachowska, M. (2018). Immunomodulatory Role of Vitamin D: A Review. *Adv Exp Med Biol*, 1108, 13-23.
22. Szymczak, I., & Pawliczak, R. (2016). The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator. *Scand J Immunol*, 83(2), 83-91.
23. Veldman, C. M., Cantorna, M. T., & DeLuca, H. F. (2000). Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D (3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys*, 374(2), 334-338.

DATOS DE LOS AUTORES.

1. **Faryd Javier Llerena Toro.** Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología. Docente la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. ULEAM Manta, Ecuador. E-mail: faryd.llerena@uleam.edu.ec
2. **Rober Ramon Ormaza Cevallos.** Magíster en Microbiología Mención Biomédica. Auxiliar de Laboratorio Clínico – Hospital Dr. Rafael Rodríguez Zambrano, Manta, Ecuador. E-mail: rrormazac@gmail.com

3. Lisseth Estefania Artieda Moreno. Magíster en Nutrición Infantil. Trabajo Autónomo. Ecuador.

E-mail: lissart@live.com

4. Danilo Adrián Navarrete Sornoza. Médico Especialista en Hematología. Docente de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. ULEAM Manta, Ecuador. E-mail:

danilo.navarrete@uleam.edu.ec

RECIBIDO: 20 de septiembre del 2022.

APROBADO: 24 de octubre del 2022.