



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

TÍTULO:

**“MODULACIÓN INMUNE DE VITAMINA D EN LA ACTIVIDAD
FUNCIONAL DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS DERIVADOS DE
MONOCITOS ENTRENADOS CON BCG”**

“IMMUNE MODULATION OF VITAMIN D IN THE FUNCTIONAL
ACTIVITY OF MONOCYTES/MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES
TRAINED WITH BCG”

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO**

AUTORA:

Martha Cristina Abigail Guevara Becerra

ASESOR:

Martin Montes Delgado

LIMA-PERÚ

2021

JURADO

Presidente: Dr. Alfredo Enrique Berrocal Kasay
Vocal: Dr. Roberto Miguel Huamanchumo Guzmán
Secretario: Dra. Wendy Guisela Sotelo Diaz

Fecha de sustentación: 15 de setiembre de 2021

Calificación: Aprobado con Honores

ASESORES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

ASESOR

Dr. Martin Montes Delgado

Jefe de Área Preclínica

Profesor auxiliar Departamento Académico De Ciencias Preclínicas Y De Apoyo

ORCID: 0000-0002-7427-347X

DEDICATORIA

A mis padres, Alfredo y Martha, y a mi hermana Angela, por su
invaluable soporte físico, emocional y espiritual.

A Dios, quien bendice a la humanidad con la ciencia y la medicina.

Soli Deo Gloria

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Martin Montes, por su ejemplo y continuo apoyo a mi
formación personal y profesional.

Al doctor Mihai Netea y su equipo en la Universidad Radboud por abrirme las
puertas de su laboratorio para entrenarme en la metodología

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Fondo de apoyo a la investigación FAMED-UPCH 2017

2018 ACMCIP Exchange Fellowship Award

Fondo de apoyo para la movilidad estudiantil DURIN-UPCH 2019

No se ha efectuado pagos a participantes del estudio

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Diseño de estudio	6
Participantes	6
Definición operacional de variables	6
Procedimiento	7
Aspectos éticos	8
Plan de análisis	9
RESULTADOS.....	10
DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES.....	18
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS.....	24
ANEXOS.....	30
Anexo 1	30

RESUMEN

Antecedentes: La inmunidad entrenada, un tipo de memoria inmune del sistema inmune innato, se distingue por una producción de citoquinas incrementada ante una estimulación antigénica secundaria. La vacuna BCG induce inmunidad entrenada mediante mecanismos epigenéticos, metabólicos y autofagia. La vitamina D induce la autofagia, sin embargo, se desconoce su rol en el entrenamiento inmune de células humanas.

Objetivo: Comparar la producción de citoquinas TNF- α e IL-6 en monocitos/macrófagos humanos entrenados con BCG o β -glucano (β G) con y sin suplemento de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD).

Métodos: Se sometió los monocitos aislados de donantes sanos a un protocolo de entrenamiento *in vitro* con BCG o β G, y se suplementó con VD (10nM o 100nM) al día 0 o día 6. Al día 7, se aislaron los sobrenadantes para análisis de citoquinas TNF- α e IL-6 por ELISA.

Resultados: La producción de citoquinas de células suplementadas solo con VD aumentó significativamente a la reestimulación ($p < 0.05$). Aunque no se pudo determinar si la VD modula la producción de citoquinas de células entrenadas, se observa una tendencia inhibitoria para β G y potenciadora para BCG.

Conclusiones: 1 α ,25-dihidroxitamina D3 induce un fenotipo de inmunidad entrenada y posiblemente potencia la inducción por BCG e inhibe a β G *in vitro*. El uso de la vitamina D en la inmunidad entrenada constituye un potencial blanco terapéutico de enfermedades infecciosas crónicas, inflamatorias y autoinmunes.

PALABRAS CLAVE: Inmunidad Innata, Vitamina D, Vacuna BCG

ABSTRACT

Background: Trained immunity, a type of immune memory of the innate immune system, is distinguished by an increased cytokine production upon secondary antigenic stimulation. The BCG vaccine induces trained immunity through epigenetic, metabolic mechanisms and autophagy. Vitamin D induces autophagy, however its role in the immune training of human cells is unknown.

Objective: To compare the production of TNF- α and IL-6 cytokines in human monocytes / macrophages trained with BCG or β -glucan (β G) with and without 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (VD) supplementation.

Methodology: Monocytes isolated from healthy donors underwent an *in vitro* training protocol with BCG or β G, and were supplemented with VD (10nM or 100nM) on day 0 or day 6. On day 7, the supernatants were isolated for cytokine analysis (TNF- α and IL-6) by ELISA.

Results: The cytokine production of cells supplemented only with VD increased significantly upon restimulation ($p < 0.05$). Although it could not be determined whether VD modulates the production of cytokines in trained cells, an inhibitory trend for β G and a potentiating trend for BCG was observed.

Conclusions: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces a phenotype of trained immunity and possibly potentiates induction by BCG and inhibits β G *in vitro*. The use of vitamin D in trained immunity constitutes a potential therapeutic target for chronic infectious, inflammatory and autoimmune diseases.

KEYWORDS: Innate Immunity, Vitamin D, BCG Vaccine

INTRODUCCIÓN

Inmunidad entrenada: definición y mecanismos inmuno-metabólicos

La clásica dicotomía entre la inmunidad innata y adaptativa sobre la incapacidad de la primera a generar memoria inmunológica ha sido desafiada por múltiples observaciones: la protección frente a la reinfección de organismos sin sistema inmune adaptativo (plantas e invertebrados) o el efecto protector heterólogo de vacunas, incluso independientemente de linfocitos T o B (1,2)

Los mecanismos protectores durante la reinfección o protección cruzada requieren que el sistema inmune innato se encuentre altamente activado. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll o tipo NOD, son un ejemplo del reconocimiento innato de patógenos; y de esta primera interacción varía la respuesta innata consecutiva. Luego del primer encuentro con el patógeno se desarrolla un tipo de memoria inmunológica en células inmunes innatas que se denomina inmunidad entrenada. Esta se define como una respuesta incrementada a una estimulación secundaria que pudiera ser al mismo u otro agente. Este tipo de inmunidad involucra componentes del sistema inmune innato como células NK, monocitos, macrófagos, PRRs y citoquinas; es inespecífica; no es mediada por reordenamientos genéticos, sino por remodelación epigenética. Se trata de un estado funcional alterado de las células inmunes innatas que persiste por meses después de eliminado el estímulo inicial. (1,3)

Los principales mecanismos asociados al desarrollo de inmunidad entrenada son la reprogramación epigenética y metabólica. (1) Las modificaciones epigenéticas asociadas incluyen cambios en la organización de la cromatina a nivel de histonas (metilación: H3K4m3 y H3K4me1, acetilación: H3K27). Además, los RNA

largos no codantes (lncRNAs) funcionan transportando metiltransferasas asociadas a genes clave en la inducción de inmunidad entrenada. El incremento en la accesibilidad de la cromatina, acetilación de histonas y reclutamiento de la RNA polimerasa II resultan de la activación masiva de la expresión de genes, cientos de veces más que los niveles basales, en corto tiempo. Esta activación es mediada por el reclutamiento de factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y miembros de la familia STAT) a promotores y potenciadores (*enhancers*) génicos premarcados con factores de transcripción de la familia PU.1. (1,4) Tras retirar el estímulo primario, un grupo de potenciadores latentes mantienen la modificación de histonas y propicia una activación más fuerte tras un estímulo secundario. (1,5) Por otro lado, la glicólisis aeróbica provee de los metabolitos celulares que propician el entrenamiento de monocitos. La expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la glicólisis también se encuentra incrementada, principalmente por la vía Akt-HIF1 α -mTOR. (6)

Evidencias epidemiológicas y clínicas de inmunidad entrenada

Varios estudios epidemiológicos en el campo de la vacunación han provisto de evidencia del entrenamiento inmune en humanos. Además del establecimiento de una memoria inmune específica, las vacunas presentan efectos no específicos y heterólogos, es decir, protección cruzada contra otros patógenos. Ensayos randomizados de vacunas contra la tuberculosis y sarampión están asociadas a una reducción significativa de la mortalidad infantil. (2) La BCG se ha asociado a respuestas incrementadas en la producción de citoquinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ tras una estimulación heteróloga (con otra cepa o especie). (7) Estas

observaciones pueden estar relacionadas a la reactividad cruzada del entrenamiento del sistema inmune innato por modificaciones epigenéticas. (8)

Inmunomodulación mediada por la vitamina D

La forma activa de la vitamina D, 1 α ,25-dihidroxitamina D₃, además de su rol fundamental en la homeostasis del calcio y fósforo, constituye un importante regulador del sistema inmune. (9–11) Esta vitamina tiene una asociación protectora con enfermedades autoinmunes como la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). (9) Es capaz de modular varias células del sistema inmune: monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B; de manera que, regula tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Las células mencionadas expresan enzimas activantes de la vitamina D, lo cual recalca el rol de esta vitamina en la homeostasis del sistema inmune.

En este sentido, la deficiencia de vitamina D está asociada a una mayor susceptibilidad de infecciones crónicas y enfermedades autoinmunes. (10) La deficiencia de la vitamina D o polimorfismos en el receptor de vitamina D (VDR) han sido asociados por varios estudios a una mayor susceptibilidad y progresión a tuberculosis activa. (11–15). Mediante la señalización por su receptor (VDR), actúa como factor de transcripción que activa elementos génicos que conforman promotores de catelicidina, un péptido antimicrobiano requerido para la acción intracelular contra *M. tuberculosis*. (16,17)

Un estudio reportó que en individuos con una incrementada susceptibilidad a tuberculosis presentaban bajos niveles séricos de 25-hidroxitamina D y una inducción ineficiente de la transcripción de catelicidina. Asimismo, se demostró que la activación de TLR de macrófagos humanos regulaban al alta la expresión

de genes del receptor de vitamina D y de la vitamina D-1-hidroxilasa, lo cual inducía catelicidina y la destrucción intracelular de *M. tuberculosis*. (18)

Por otro lado, la evidencia clínica sobre el uso preventivo de la vitamina D en tuberculosis es contradictoria. Un ensayo clínico realizado en niños en Mongolia encontró que la suplementación de vitamina D no redujo el riesgo de infección o enfermedad por tuberculosis (TB). (19) Un ensayo randomizado de doble ciego, con una muestra de 192 adultos y tras un seguimiento de 6 semanas, se reportó que una dosis única de 2.5 mg de vitamina D incrementa significativamente la habilidad de la sangre total de restringir el crecimiento de la micobacteria. (20)

Otro estudio realizado en Guinea-Bissau, que realizó el seguimiento de 281 pacientes con TB por 12 meses desde el inicio del tratamiento antituberculoso, intervino con 100 000 IU de colecalciferol al iniciar el enrolamiento y 5-8 meses después de iniciado el tratamiento. Concluyeron que la vitamina D no mejoraba el cuadro de TB y ejercía ningún efecto en la mortalidad de los pacientes, no obstante, posiblemente la dosis haya sido insuficiente. (21) Un estudio en modelo animal halló que la vitamina D mejoraba la función inmune de ratones inmunosuprimidos al estimular la proliferación de células T y elevar la producción de IL-2 a una dosis de 6 IU/g. (22)

Al no existir un consenso general sobre la utilidad de la vitamina D en la prevención de infecciones, nuestro estudio busca evaluar los efectos de esta vitamina en la inmunidad entrenada.

Aplicación de la inmunidad entrenada en el diseño de vacunas o coadyuvantes

La potenciación de la vacunación en situaciones de epidemia o en países con alta endemnicidad de enfermedades infecciosas o en pacientes con inmunodeficiencias

constituye un potencial ámbito de aplicación para la inmunidad entrenada. Dado que, mejorar la respuesta inmune de células innatas puede optimizar la consecuente respuesta adaptativa a vacunas clásicas en sanos o pacientes inmunocomprometidos, la inmunidad entrenada podría desempeñar un rol crítico en el diseño de coadyuvantes o mejoramiento de esquemas de vacunación. (23)

NOD2 y Autofagia: convergencia entre la vitamina D y la inmunidad entrenada

La inmunidad entrenada inducida por BCG requiere de la activación de NOD2 (24) y de la autofagia. (25) La vitamina D estimula la expresión de NOD2 (26) e induce la autofagia en macrófagos, promueve la maduración de autofagosomas en dependencia de catelicidina, restringe la supervivencia de las micobacterias. (27) Al converger en estas vías, se hipotetiza que la vitamina D tenga un rol en la inducción o modulación de la inmunidad entrenada. La regulación de este tipo de inmunidad sería crítica para limitar su rol perjudicial en la patogénesis de condiciones inflamatorias o autoinmunes, preservando la potenciación de funciones microbicidas en enfermedades infecciosas como la tuberculosis, que se caracterizan por un inadecuado control inicial por parte de las células innatas. Por lo tanto, nuestro estudio plantea evaluar el rol de la vitamina D en la actividad funcional de monocitos/macrófagos entrenados con BCG.

OBJETIVO

Comparar la producción de citoquinas (TNF- α , IL-6) en monocitos/macrófagos, entrenados con BCG o β -glucano (β G), con y sin suplemento de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD)

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de estudio

Modelo *in vitro* de entrenamiento inmune con BCG o β G en células humanas e inmunoensayos para medir comparativamente la producción de citoquinas.

Participantes

Se reclutó 10 voluntarios sanos, contactos directos, bajo los criterios de inclusión:

a) Individuos sanos, b) Edades 18-59 años; y criterios de exclusión: a) individuos con PPD positivo, antecedente de VIH, tuberculosis o HTLV-1, b) Gestantes, c) Individuos que cursen con una enfermedad sistémica, d) Individuos vacunados en los últimos 3 meses.

Los voluntarios eran sanos y no recibían suplemento de vitamina D. No se determinó el nivel sérico previo de 25-hidroxivitamina-D en los individuos reclutados.

Definición operacional de variables

Se definieron las siguientes variables: 1) Concentración de citoquinas, variable dependiente cuantitativa-continua, de razón; definida operacionalmente como concentración en pg/mL y conceptualmente como respuesta a estimulación secundaria. 2) Estimulación inicial, variable independiente cualitativa, nominal; definida operacionalmente como estimulación con BCG o β G y conceptualmente como estímulo primario (en el día 0) e inductor conocido de inmunidad entrenada. 3) Suplementación con VD, variable independiente cualitativa, nominal; definida operacionalmente como suplementación con $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 a una dosis de 10nM o 100nM y conceptualmente como suplemento de inmunomodulador.

Procedimiento

Convocatoria a participantes

Se reclutó 10 participantes voluntarios sanos, contactos directos: 7 para toma de muestra de sangre periférica y 3 donantes de *buffy coat*.

Extracción de sangre periférica

Se extrajo sangre venosa periférica y se recolectó en tubos vacutainer heparinizados.

Aislamiento de PBMCs

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich).

Conteo celular

Se realizó el conteo celular para ajuste de concentraciones en placa de cultivo con z1 Coulter Particle counter (Beckmann Coulter) o con hemocitómetro.

Preparación de medio de cultivo completo para monocitos

Se usó medio de cultivo completo a 37°C para los sucesivos procedimientos.

Consiste en RPMI 1640 Dutch-modified con glutamato (2mM), piruvato (1mM) y gentamicina (50µg/ml) (Thermo-Fisher).

Aislamiento de monocitos humanos

Se aislaron monocitos por centrifugación en gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) o por selección negativa con beads magnéticos con el kit Pan Monocyte Isolation (Miltenyi Biotec). Se llevó la suspensión celular en medio de cultivo completo a una concentración de 10^6 células/mL y se añadió 100 µL por pocillo en una placa de 96 pocillos (10^5 células/pocillo). Se incubó por 1h a 37°C para aislar los monocitos adherentes.

Tratamiento con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD)

En el día 0, los monocitos se cultivaron en RPMI completo a 37°C, 5% CO₂, por 24 horas en 10% de suero humano. Se cultivó un grupo de células con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (Sigma-Aldrich) a dos concentraciones: 10nM o 100nM. Como solvente (vehículo) para la solución de VD se usó etanol al 95%; la concentración final de etanol no excedió 1% (v/v) en el medio de cultivo. El grupo control se incubó sin VD, con RPMI y el vehículo.

Se incubó al día 6 con dosis de 10nM o 100nM de VD a otros dos grupos de monocitos/macrófagos entrenados que no recibieron suplemento de VD al día 0. Se incubó por 30 minutos, previo a la estimulación secundaria con LPS.

Modelo de entrenamiento in vitro inducido por BCG

El día 0 se añadió RPMI 10% suero (control negativo) o BCG (5 μ g/ml, SSI) o β -glucano (1 μ g/mL, *Candida albicans*). Se incubó por 24 horas a 37°C.

Luego, el sobrenadante se desechó y se reemplazó con RPMI fresco 10% suero. Al día 3 se refrescó el medio de cultivo RPMI completo con 10% suero. Al día 6 de incubación, el sobrenadante fue descartado y las células fueron estimuladas con *E. coli* LPS (10 ng/mL) o RPMI como control negativo durante 24 horas adicionales. Al día 7, los sobrenadantes se aislaron a -20°C.

Ensayo de citoquinas

Los sobrenadantes almacenados a -20°C. Luego, se midió la concentración de citoquinas (TNF- α e IL-6) mediante ELISA (R&D, DuoSet).

Aspectos éticos

El presente estudio ha usado monocitos aislados de adultos voluntarios sanos bajo consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética UPCH. (Anexo 1).

Plan de análisis

Se incluyeron muestras de 6 participantes en el análisis comparativo de producción de citoquinas por células suplementadas solo con $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D3; no se incluyó los datos de 3 muestras en el análisis de citoquinas por células entrenadas por defecto en los estímulos iniciales (BCG y β G).

Se comparó la producción de citoquinas de un mismo donante, bajo diferentes estímulos. Los resultados se presentan en las tablas y gráficos de barras que representan la mediana y rangos intercuartiles. Dado que la producción de citoquinas es no paramétrica, se comparó medianas entre grupos pareados –con y sin suplemento de $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D3– con la prueba estadística Wilcoxon. Se usó el software GraphPad Prism v 8.2.1. Valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

El tamaño de muestra fue calculado mediante el programa G*Power (v.3.1.9.3). Usando data de estudios previos de entrenamiento inmune con BCG, se calculó un poder del 80% y un nivel de significancia del 95% para demostrar una diferencia de 1000 pg/ml con desviación estándar 500 pg/mL para la diferencia de medias de producción de citoquina TNF- α de las células suplementadas con $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D3 en comparación a aquellas sin este suplemento. Con estos parámetros, una muestra de 5 participantes permite detectar como estadísticamente significativas, diferencias iguales o mayores a las propuestas.

RESULTADOS

1 α ,25-dihidroxitamina D3 suplementada al día 0 induce un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias, sin estímulo inicial BCG o β G

Ante la estimulación secundaria (LPS), la mediana de producción de citoquinas IL-6 y TNF- α aumentó en monocitos suplementados solo con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD) al día 0. La diferencia fue estadísticamente significativa para IL-6 con VD 100nM: 1581 pg/mL (IQR = 1308 – 1888) vs 638.6 pg/mL (sin VD, IQR = 307.5 – 1060), p=0.0312; y para TNF- α con VD 10nM: 558.4 pg/mL (IQR = 421.1 – 918.9) vs 209.2 pg/mL (sin VD, IQR = 122.2 - 381.3), p=0.0312; y a 100nM: 1042 pg/mL (IQR = 615.9 – 1550) vs 209.2 pg/mL (sin VD, IQR = 122.2 - 381.3), p=0.0312. ([Tabla1A](#), [Figura 2](#))

1 α ,25-dihidroxitamina D3 suplementada al día 6 en la producción de citoquinas proinflamatorias, sin estímulo inicial BCG o β G

Ante la estimulación secundaria (LPS), se observa una ligera disminución en la producción de citoquinas en presencia de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa al comparar la producción de IL-6 con 10nM VD: 605.3 pg/mL (IQR = 306.9 – 730.2) vs 638.6 pg/mL (sin VD, IQR = 307.5 – 1060), p = 0.3125; o 100nM VD: 530.4 pg/mL (IQR= 175.6 – 768) vs 636.6 pg/mL (sin VD, IQR = 307.5 – 1060), p = 0.8438; ni para la producción de TNF- α con 10 nM VD: 225.6 pg/mL (IQR = 116.4 - 298.2) vs 209.2 pg/mL (sin VD, IQR = 122.2–381.3), p=0.4375; o 100 nM VD: 199.1 (IQR = 132.1 – 400.8) vs 209.2 (sin VD, IQR = 122.2–381.3), p=0.8438. ([Tabla 2A](#), [Figura 3](#))

1 α ,25-dihidroxitamina D3 suplementada al día 0 en la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos entrenados con BCG.

Al comparar monocitos entrenados con BCG sin y con suplemento de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD) al día 0 no se encuentran diferencias estadísticamente significativas para la mediana de producción de IL-6 con VD 10nM: 950.6 pg/mL (IQR = 906.8 – 982) vs 824.9 pg/mL (sin VD, IQR = 813.8 – 1453), $p > 0.999$; o 100nM: 702 pg/mL (IQR = 687 – 1433) vs 824.9 pg/mL (sin VD, IQR = 813.8 – 1453), $p = 0.25$. En la mediana de producción de TNF- α se observa un incremento en presencia de VD; no obstante, las diferencias no son estadísticamente significativas con 10nM: 371.7 pg/mL (IQR = 338.3 – 949.6) vs 321.7 pg/mL (sin VD, IQR = 250.8 - 794.1), $p = 0.25$; o 100nM: 405 pg/mL (IQR = 392.5 – 1146) vs 321.7 pg/mL (sin VD, IQR = 250.8 - 794.1), $p = 0.25$. ([Tabla 1B](#), [Figura 4](#))

1 α ,25-dihidroxitamina D3 suplementada al día 0 en la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos entrenados con β G.

La producción de citoquinas de monocitos entrenados con β -glucano (β G) es menor en células suplementadas con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD) al día 0 a una dosis de 10nM, la mediana de producción de IL-6 es 742 pg/mL (IQR = 702 – 1087) vs 2042 pg/mL (sin VD, IQR = 1546 – 2793), aunque no estadísticamente significativo ($p = 0.25$). Dicha diferencia no se observa a una dosis de 100nM: 2305 pg/mL (IQR = 808.2 – 2922) vs 2042 pg/mL (sin VD, IQR = 1546 – 2793), $p > 0.99$. En cuanto a la producción de TNF- α , solo a una dosis de 10nM se observó una disminución: 321.7 pg/mL (IQR = 296.7 – 1383) vs 1255 pg/mL (sin VD, IQR = 880 – 1942), $p = 0.25$; y no a 100 nM: 1563 (IQR = 1553 – 1601) vs 1255 pg/mL (sin VD, IQR = 880 – 1942), $p = 0.75$. ([Tabla 1C](#), [Figura 5](#))

1 α ,25-dihidroxitamina D3 suplementada al día 6 en la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos entrenados con BCG.

1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD) suplementada al día 6, en células entrenadas con BCG, provocó un incremento de IL-6 a una dosis de 10nM: 1087 pg/mL (IQR = 450.6 – 1765) vs 824.9 pg/mL (sin VD, IQR = 813.8 – 1453), $p=>0.99$; y 100nM: 1253 pg/mL (IQR = 936.3 – 3119) vs 824.9 pg/mL (sin VD, IQR = 813.8 – 1453), $p=0.25$; aunque no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, la mediana de producción de TNF- α tuvo un incremento, no estadísticamente significativo, con VD 10nM: 375.8 pg/mL (IQR = 75.8 – 794.1) vs 321.7 pg/mL (sin VD, IQR = 250.8 - 794.1), $p=>0.99$; y a una dosis 100nM: 513.3 pg/mL (IQR = 146.7 – 642.2) vs 321.7 pg/mL (sin VD, IQR = 250.8 - 794.1), $p=>0.99$. ([Tabla 2B](#), [Figura 6](#))

1 α ,25-dihidroxitamina D3 suplementada al día 6 en la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos entrenados con β G.

El efecto observado sobre β -glucano es opuesto al notado con BCG. La mediana de producción de IL-6 es menor con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD) a 10 nM: 1388 pg/mL (IQR = 796.9 – 1851) vs 2042 pg/mL (sin VD, IQR = 1546 – 2793), $p=0.25$; o 100 nM: 1308 pg/mL (IQR = 1005 – 2088) vs 2042 pg/mL (sin VD, IQR = 1546 – 2793), $p=0.25$. Similar observación se da para TNF- α , en que la mediana de producción se redujo en los grupos suplementados con 10nM VD: 921.7 pg/mL (IQR = 830 – 1327) vs 1255 pg/mL (sin VD, IQR = 880 – 1942), $p=0.25$; o 100nM VD: 775.8 pg/mL (IQR = 588.3 – 1216) vs 1255 pg/mL (sin VD, IQR = 880 – 1942), $p=0.25$; no obstante, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas. ([Tabla 2C](#), [Figura 7](#))

DISCUSIÓN

En el presente estudio comparamos el efecto de la suplementación de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en monocitos cultivados *in vitro* bajo diferentes parámetros. El modelo experimental de entrenamiento inmune ha sido ampliamente caracterizado, siendo la BCG y el β -glucano, los inductores más conocidos (28,29). Asimismo, el aumento de producción de citoquinas proinflamatorias a la reestimulación con LPS es una característica principal del fenotipo de células innatas entrenadas. Se analizó el efecto únicamente de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en la producción de citoquinas a la re-estimulación al día 6 y se observó un aumento significativo, lo cual propone la posibilidad que $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 tenga capacidad de inducir inmunidad entrenada, y si ello depende de la dosis administrada. Es poco probable que esta observación sea producto de un efecto proliferativo de esta vitamina sobre los monocitos dado que ejerció un efecto diferente en el modelo de entrenamiento con BCG o β -glucano ([figura 1](#)). Este hallazgo sería congruente con la hipótesis que $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, en interacción con vías como la autofagia y NOD2, pueda inducir un fenotipo de inmunidad entrenada. Asimismo, se ha encontrado que $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 tiene efectos a nivel epigenético, específicamente modificando las histonas H3K4me3 y H3K27ac (30) que son importantes marcadores epigenéticos para la inmunidad entrenada. (1,5) Además, el resultado encontrado en nuestro estudio constituye una relevante prueba de principio que amerita analizar a futuro el efecto de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en el inmuno-metabolismo de los monocitos/macrófagos, y particularmente su impacto en vías metabólicas esenciales para el desarrollo del fenotipo entrenado: glicólisis, ciclo de los ácidos

tricarboxílicos con repleción de fumarato y la vía del mevalonato. (31) En estudios transcriptómicos se ha visto que los genes asociados a estas vías metabólicas aumentan su expresión tras el tratamiento *in vitro* con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (32). Por tanto, el presente trabajo da paso a investigar mediante estudios metabolómicos y epigenómicos la capacidad de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 para inducir la inmunidad entrenada.

En la suplementación de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 al día 0, se encontraron resultados opuestos en la producción de citoquinas en monocitos entrenados con BCG comparado al inducido por β -glucano. Aunque no se observó algún efecto significativo sobre la producción de IL-6 por monocitos entrenados con BCG, la producción de TNF- α aumentó. Este resultado podría explicarse por inducción de NOD2 y autofagia mediada por 1 α ,25-dihidroxitamina D3; ya que estos mecanismos son necesarios para el desarrollo de inmunidad entrenada específicamente por BCG. Ello también podría respaldar por qué cuando 1 α ,25-dihidroxitamina D3 es suplementada al día 6 no se observó el mismo efecto inhibitorio sobre el fenotipo de las células entrenadas con β -glucano. En el caso de la BCG se hipotetiza que 1 α ,25-dihidroxitamina D3 tiene un efecto potenciador de inmunidad entrenada que merece ampliar el tamaño muestral de este estudio e incluir métodos como microscopía fluorescente para demostrar la activación de la autofagia y como inmunoprecipitación de cromatina para evidenciar remodelamiento epigenético.

Por otro lado, la producción de citoquinas fue consistentemente menor en monocitos entrenados con β -glucano y suplementados con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 tanto al día 0 como al día 6. Aunque las diferencias no

fueron estadísticamente significativas, esta observación es congruente con la capacidad antiinflamatoria de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, específicamente reduciendo la expresión de dectina-1 (33), que es un receptor crucial para el reconocimiento de β -glucano y señalización de la respuesta proinflamatoria de macrófagos. (34)

Estudios previos *in vitro* han evaluado el efecto de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 tras 24h de la exposición inicial y han evidenciado consistentemente una acción antiinflamatoria. (35) Nuestro estudio difiere en que $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 se suplementó al día 0 y se evidenció un fenotipo similar al de células entrenadas. Sin embargo, el escenario anterior fue evaluado en nuestro estudio al exponer a las células a $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en el día 6 y se encontraron hallazgos coherentes con los estudios previos tanto para las condiciones sin estímulo inicial o con β -glucano como estímulo primario (**figura 3 y 7**). Pese a que los resultados no fueron estadísticamente significativos, se plantea que estos podrían confirmarse al aumentar el tamaño muestral pues se observa una tendencia congruente con el perfil antiinflamatorio de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 que se ha observado en estudios de varias líneas celulares, PBMCs y monocitos. (34–36) Como mecanismos se proponen la disminución de la expresión del TLR2, TL4, p38 y p42/42 fosforilado, transductor de señal fosforilado, activador de transcripción 5 y disminución de especies reactivas de oxígeno. (35)

En este sentido, se plantea que $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 es un potencial inductor y modulador de inmunidad entrenada por lo que amerita ampliar el presente estudio e incluir otros métodos para dilucidar los mecanismos que subyacen a estos dos perfiles aparentemente opuestos. Se hipotetiza que la

vitamina D, vía NOD2 y autofagia, tenga la capacidad de inducir inmunidad entrenada y potenciar la inducción por BCG; y que vía inhibición de la expresión de dectina-1, se inhiba el efecto del β -glucano.

Asimismo, se requieren estudios *in vivo* para demostrar si la suplementación de vitamina D produce un fenotipo de inmunidad entrenada o potencia el efecto de la administración de BCG en individuos sanos evaluando cambios epigenéticos. Por otro lado, es necesario investigar si la inhibición del receptor de vitamina D o en pacientes con deficiencia de esta vitamina existe defectos en la inducción de inmunidad entrenada por BCG para poder corroborar nuestra hipótesis.

En cuanto a los efectos observados sobre el modelo de entrenamiento con β -glucano, $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D₃ constituye un potencial candidato a regulador de inmunidad entrenada en situaciones donde puede actuar de forma adversa a la salud, propiciando patologías inflamatorias, aterosclerosis vía LDL oxidado (37) o autoinmunidad (38). Amerita explorarse en futuras investigaciones cómo aprovechar la capacidad de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D₃ de inhibir los patrones inflamatorios exacerbados de inmunidad entrenada dado que este mecanismo pudiera explicar su asociación protectora contra infecciones crónicas –aquellas mediadas por una respuesta exagerada del huésped–, enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

Las limitaciones del estudio radican principalmente en el reducido tamaño muestral que dificulta responder con adecuado poder estadístico. Además, siendo un estudio *in vitro* no es posible hacer una inferencia directa a los efectos *in vivo* dado que los monocitos de sangre periférica circulan por tiempo limitado hasta migrar a tejidos específicos donde se desarrolla en macrófagos. No obstante, el

fenotipo desarrollado por monocitos circulantes influye en la diferenciación a macrófagos puesto que el entrenamiento implica remodelamiento epigenético. Por otro lado, nuestro estudio solo ha evaluado una de las características de la inmunidad entrenada: la producción incrementada de citoquinas. Sin embargo, para concluir que $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 efectivamente induce el entrenamiento de monocitos se requieren comprobar cambios epigenéticos y metabólicos.

CONCLUSIONES

En este estudio, demostramos que la suplementación de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 produce un patrón de producción de citoquinas semejante al fenotipo de inmunidad entrenada *in vitro*. Con la ampliación del tamaño muestral, podría comprobarse los efectos de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 sobre el entrenamiento *in vitro* por BCG y β -glucano. Los efectos moduladores de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en la inmunidad entrenada constituyen un potencial blanco terapéutico y preventivo de enfermedades infecciosas crónicas, inflamatorias y autoinmunes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Netea M, Joosten L, Latz E, Mills K, Natoli G, Stunnenberg H, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098-aaf1098.
2. Netea M, Latz E, Mills K, O'Neill L. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nat Immunol*. 2015 June 18; 16(7): 675–679
3. Netea M, Quintin J, van der Meer J. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):355-361.
4. Ghisletti S, Barozzi I, Mietton F, Polletti S, De Santa F, Venturini E, et al. Identification and Characterization of Enhancers Controlling the Inflammatory Gene Expression Program in Macrophages. *Immunity*. 2010;32(3):317-328.
5. Ostuni R, Piccolo V, Barozzi I, Polletti S, Termanini A, Bonifacio S et al. Latent Enhancers Activated by Stimulation in Differentiated Cells. *Cell*. 2013;152(1-2):157-171.
6. Cheng S, Quintin J, Cramer R, Shepardson K, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR-and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 2014 Sep 26;345(6204):1250684.
7. Jensen K, Larsen N, Biering-Sørensen S, Andersen A, Eriksen H, Monteiro I, et al. Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth weight infants in Guinea-Bissau: a randomized-controlled trial. *J Infect Dis*. 2015 Mar 15;211(6):956-67.
8. Benn C, Netea M, Selin L, Aaby P. A small jab—a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends immunol*. 2013 Sep 30;34(9):431-9.

9. Cantorna M, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec 1;80(6):1717S-20S.
10. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Aug 31;10(4):482-96.
11. Gibney K, MacGregor L, Leder K, Torresi J, Marshall C, Ebeling P, et al. Vitamin D deficiency is associated with tuberculosis and latent tuberculosis infection in immigrants from sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb 1;46(3):443-6.
12. Iftikhar R, Kamran S, Qadir A, Haider E, Bin U. Vitamin D deficiency in patients with tuberculosis. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2013 Nov;23(10):780-3
13. Talat N, Perry S, Parsonnet J, Dawood G, Hussain R. Vitamin D Deficiency and Tuberculosis Progression. *Emerg Infect Dis.* 2010 May;16(5):853-5.
14. Wilkinson R, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet.* 2000 Feb 19;355(9204):618-21.
15. Huang S, Wang X, Liu Z, Cao W, Han Y, Ma A, et al. Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016 Dec 28;11:91-102
16. Wang T, Nestel F, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):2909-12.
17. Liu P, Stenger S, Tang D, Modlin R. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is

- dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2060-3.
18. Liu P, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan B, Krutzik S, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006 Mar 24;311(5768):1770-3.
 19. Ganmaa D, Uyanga B, Zhou X, Gantsetseg G, Delgerekh B, Enkhmaa D, et al. Vitamin D supplements for prevention of tuberculosis infection and disease. *N Engl J Med*. 2020 Jul 23;383(4):359-368.
 20. Martineau A, Wilkinson R, Wilkinson K, Newton S, Kampmann B, Hall B, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jul 15;176(2):208-13.
 21. Wejse C, Gomes V, Rabna P, Gustafson P, Aaby P, Lisse I, et al. Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 1;179(9):843-50.
 22. Wang Z, Wang Y, Xu B, Liu J, Ren Y, Dai Z, et al. Vitamin D improves immune function in immunosuppressant mice induced by glucocorticoid. *Biomed Rep*. 2017 Jan;6(1):120-4.
 23. Netea M. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur J Clin Invest*. 2013 Aug;43(8):881-4.
 24. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten L, Ifrim D, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 23;109(43):17537-42.
 25. Buffen K, Oosting M, Quintin J, Ng A, Kleinnijenhuis J, Kumar V, et al. Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to

- intravesical BCG therapy for bladder cancer. *PLoS Pathog.* 2014 Oct 30;10(10):e1004485.
26. Wang T, Dabbas B, Laperriere D, Bitton A, Soualhine H, Tavera-Mendoza L, et al. Direct and indirect induction by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin β 2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem.* 2010 Jan 22;285(4):2227-31.
 27. Yuk JM, Shin D, Lee H, Yang C, Jin H, Kim K, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell.* 2009;6(3):231-43.
 28. Bekkering S, Blok B, Joosten L, Riksen N, van Crevel R, Netea M. In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2016 Dec 5;23(12):926-33.
 29. Domínguez-Andrés J, Arts R, Bekkering S, Bahrar H, Blok B, de Bree L, et al. In vitro induction of trained immunity in adherent human monocytes. *STAR Protoc.* 2021 Feb 24;2(1):100365.
 30. Nurminen V, Neme A, Seuter S, Carlberg C. The impact of the vitamin D-modulated epigenome on VDR target gene regulation. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018 Aug;1861(8):697-705.
 31. Riksen N, Netea M. Immunometabolic control of trained immunity. *Mol Aspects Med.* 2021;77:100897.
 32. Muñoz Garcia A, Kutmon M, Eijssen L, Hewison M, Evelo C, Coort S. Pathway analysis of transcriptomic data shows immunometabolic effects of vitamin D. *J Mol Endocrinol.* 2018;60(2):95-108.
 33. Khoo A, Chai L, Koenen H, Oosting M, Steinmeyer A, Zuegel U, et al. Vitamin D3 down-regulates proinflammatory cytokine response to *Mycobacterium tuberculosis* through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. *Cytokine.* 2011 Aug;55(2):294-300.

34. Brown G, Herre J, Williams D, Willment J, Marshall A, Gordon S.
Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J Exp Med*. 2003
May 5;197(9):1119-24.
35. Calton E, Keane K, Newsholme P, Soares M. The impact of vitamin D
levels on inflammatory status: a systematic review of immune cell studies.
PloS one. 2015 Nov 3;10(11):e0141770.
36. Hoe E, Nathanielsz J, Toh Z, Spry L, Marimla R, Balloch A, et al. Anti-
inflammatory effects of vitamin D on human immune cells in the context
of bacterial infection. *Nutrients*. 2016 Dec;8(12):806.
37. Leentjens J, Bekkering S, Joosten L, Netea M, Burgner D, Riksen N.
Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the
development of atherosclerosis. *Circ Res*. 2018 Mar 2;122(5):664-9.
38. Arts R, Joosten L, Netea M. The potential role of trained immunity in
autoimmune and autoinflammatory disorders. *Front Immunol*. 2018 Feb
20;9:298.

TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

Tabla 1: Mediana (y rangos intercuartiles) de producción de citoquinas TNF- α e IL-6 (pg/mL) con la suplementación de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 al día 0

(A) Solo 1α,25-dihidroxitamina D3 (VD)					
	RPMI (VD-)	VD10nM	Valor p	VD100nM	Valor p
IL-6	638.6 (307.5 – 1060)	1230 (791.8 – 1597)	0.0625	1581 (1308 – 1888)	0.0312
TNF-α	209.2 (122.2–381.3)	558.4 (421.1–918.9)	0.0312	1042 (615.9 – 1550)	0.0312
(B) Estímulo 1º: BCG					
	RPMI (VD-)	VD10nM	Valor p	VD100nM	Valor p
IL-6	824.9 (813.8 – 1453)	950.6 (906.8 – 982)	>0.99	702.0 (687 – 1433)	0.25
TNF-α	321.7 (250.8–794.1)	371.7 (338.3 - 949.6)	0.25	405.0 (392.5 - 1146)	0.25
(C) Estímulo 1º: β-glucano					
	RPMI (VD-)	VD10nM	Valor p	VD100nM	Valor p
IL-6	2042 (1546 – 2793)	742.0 (702 – 1087)	0.25	2305 (808.2 – 2922)	>0.99
TNF-α	1255 (880 – 1942)	321.7 (296.7 – 1383)	0.25	1563 (1553 – 1601)	0.75

*Valores p de la comparación de medianas: condición VD 10nM o 100nM vs condición VD- (sin vitamina D, solo RPMI + vehículo), Wilcoxon.

Tabla 2: Mediana (y rangos intercuartiles) de producción de citoquinas TNF- α e IL-6 (pg/mL) con la suplementación de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 al día 6

(A) Solo 1α,25-dihidroxitamina D3 (VD)					
	RPMI (VD-)	VD10nM	Valor p	VD100nM	Valor p
IL-6	638.6 (307.5 – 1060)	605.3 (306.9 - 730.2)	0.3125	530.4 (175.6 - 768)	0.8438
TNF-α	209.2 (122.2–381.3)	225.6 (116.4 - 298.2)	0.4375	199.1 (132.1–400.8)	0.8438
(B) Estímulo 1º: BCG					
	RPMI (VD-)	VD10nM	Valor p	VD100nM	Valor p
IL-6	824.9 (813.8 – 1453)	1087 (450.6 – 1765)	>0.99	1253 (936.3 - 3119)	0.25
TNF-α	321.7 (250.8–794.1)	375.8 (75.8–794.1)	>0.99	513.3 (146.7–642.2)	>0.99
(C) Estímulo 1º: β-glucano					
	RPMI (VD-)	VD10nM	Valor p	VD100nM	Valor p
IL-6	2042 (1546 – 2793)	1388 (796.9 - 1851)	0.25	1308 (1005 - 2088)	0.25
TNF-α	1255 (880 – 1942)	921.7 (830 - 1327)	0.25	775.8 (588.3 - 1216)	0.25

*Valores p de la comparación de medianas: condición VD 10nM o 100nM vs condición VD- (sin vitamina D, solo RPMI + vehículo), Wilcoxon.

Figura 1: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos con o sin suplemento de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 al día 0 y 6, bajo diferentes estímulos.

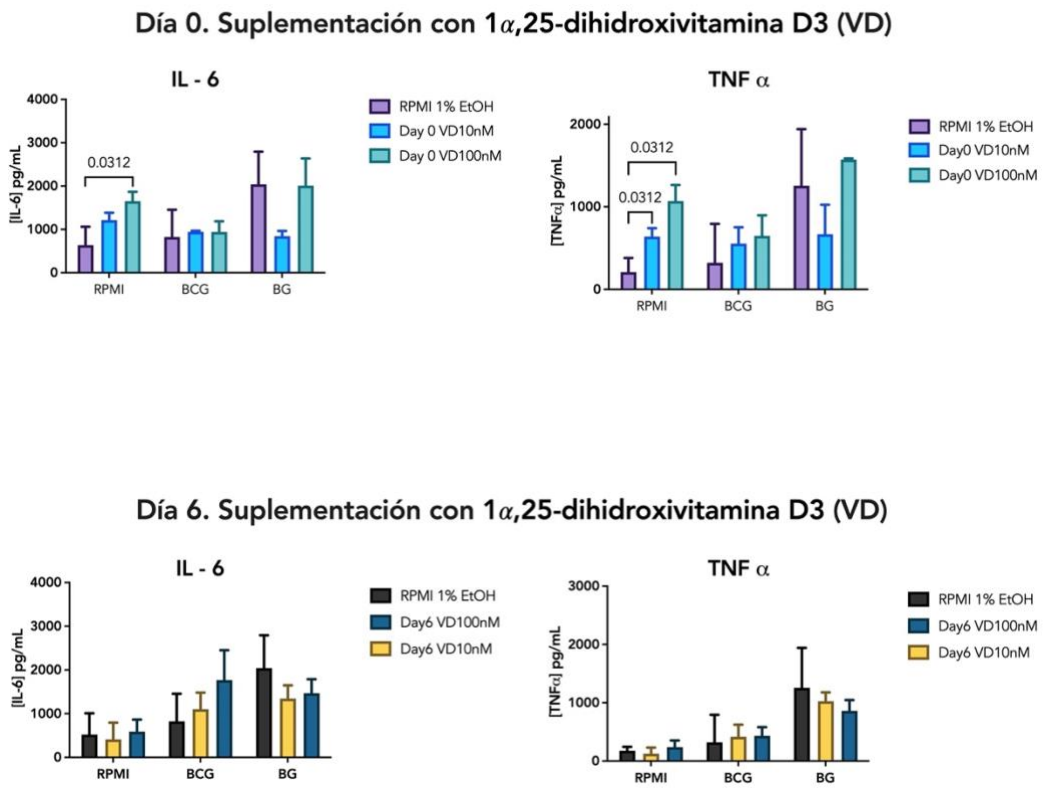


Figura 2: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos suplementados con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 al día 0, sin estímulo primario BCG o βG (N=6)

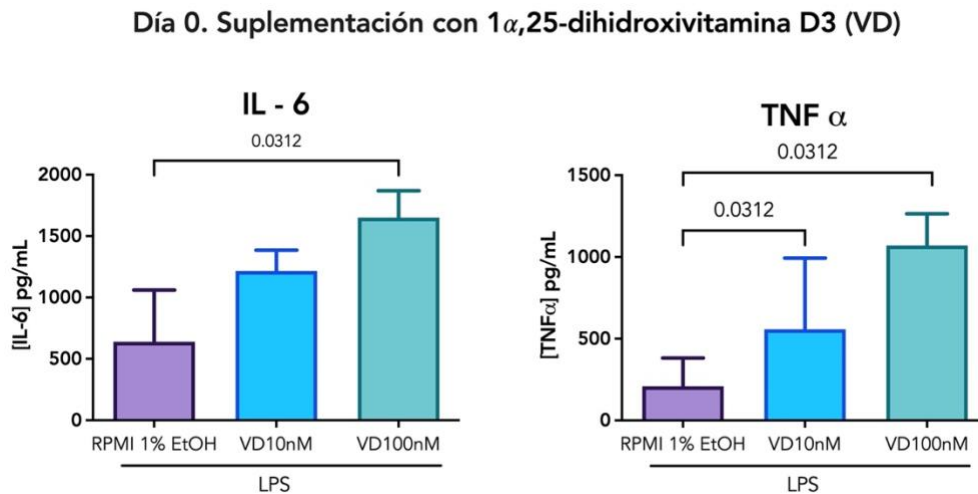


Figura 3: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos suplementados con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 al día 6, sin estímulo primario BCG o βG (N=6)

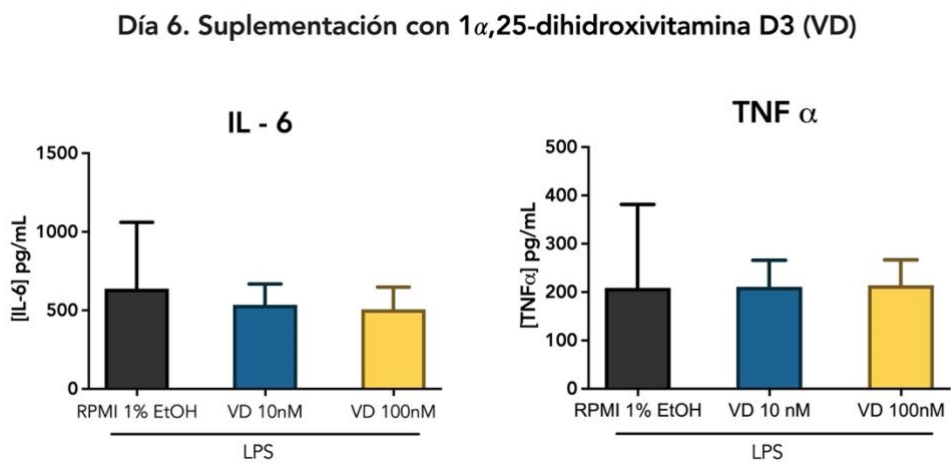


Figura 4: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos suplementados con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 al día 0, con estímulo primario de BCG (N=3)

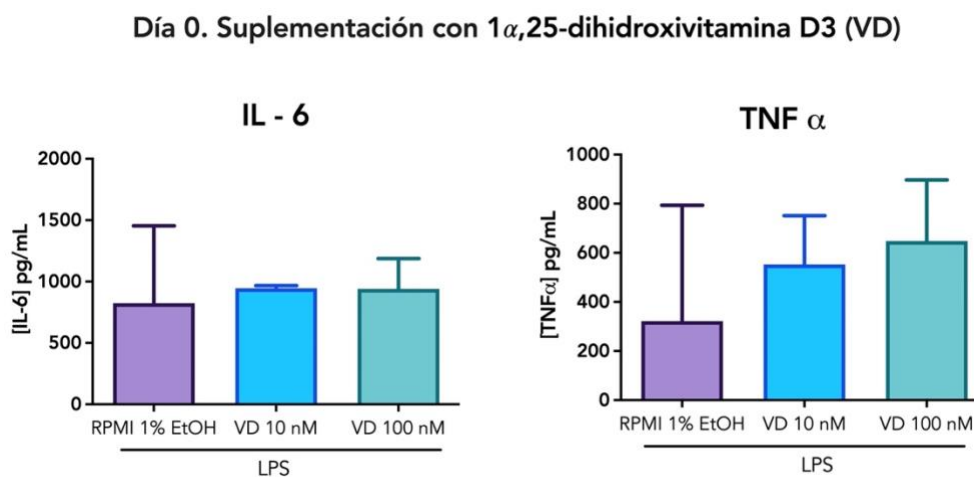


Figura 5: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos suplementados con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 al día 0, con estímulo primario de β G (N=3)

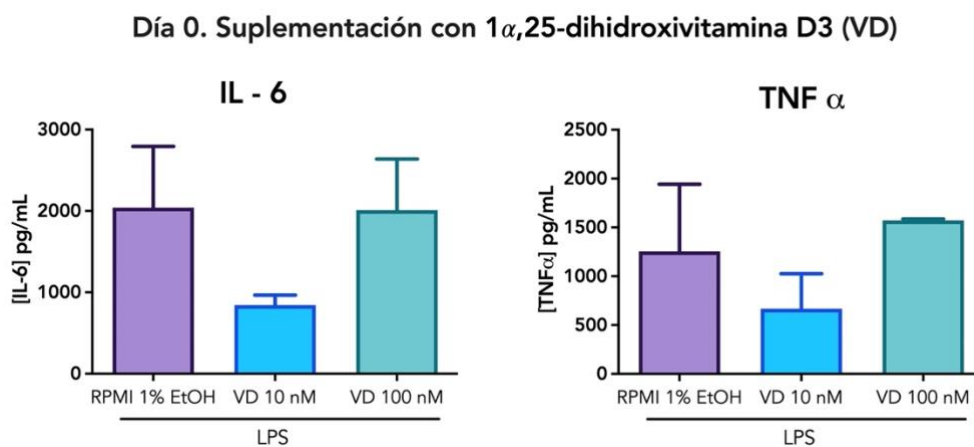


Figura 6: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos suplementados con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 al día 6, con estímulo primario de BCG (N=3)

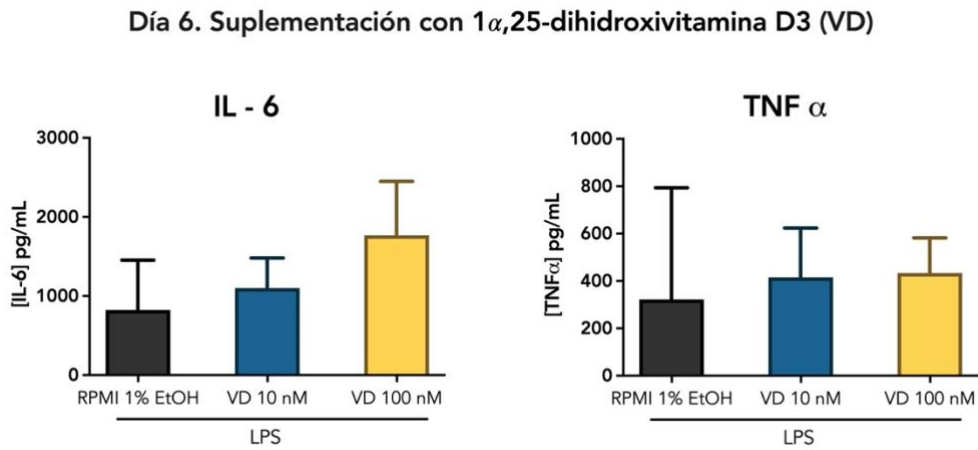


Figura 7: Producción de citoquinas a la reestimulación con LPS en monocitos suplementados con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 al día 6, con estímulo primario de β G (N=3)

