



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas



Título del trabajo

Evaluación *in vitro* del efecto de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos en la inducción de cortisol y dehidroepiandrosterona

Tesis que presenta

González Muñiz Oscar Eduardo

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Codirección

Dr. Bruno Rivas Santiago
Dra. Gabriela Navarro Tovar

San Luis Potosí, SLP, México

Julio, 2023

Restricciones de uso**DERECHOS RESERVADOS****PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este trabajo de tesis está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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 se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Créditos institucionales

Este proyecto se realizó en Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas adscrita al Instituto Mexicano del Seguro Social, en el periodo comprendido entre agosto del año 2021 y julio del 2023, bajo la dirección del Dr. Bruno Rivas Santiago y la Dra. Gabriela Navarro Tovar y fue apoyado por el “Proyecto 2022 de Reactivación de protocolos beneficiados en Convocatorias Institucionales con cierre de anticipado por extinción del Fondo de Investigación en Salud (FIS)”, para el proyecto de investigación titulado: “Modulación de los péptidos antimicrobianos por el cortisol y la DHEA durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*”, el cual se encuentra aprobado por el Comité Nacional de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Comité Nacional de Investigación Científica bajo el número de registro R-2016-785-012.

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrado (SNP) del CONAHCyT, registro 003382. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 805021. No. CVU: 1144386

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma "turnitin" (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reportó un 8 % de similitud.

Evaluación in vitro del efecto de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos en la inducción de cortisol y dehidroepiandrosterona

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

ÍNDICE DE SIMILITUD



Evaluación in vitro del efecto de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos en la inducción de cortisol y dehidroepiandrosterona por González Muñoz Oscar Eduardo, et al., se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

San Luís Potosí,
SLP. A 18 de julio
del 2023

**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de Maestría QFB. Oscar Eduardo González Muñoz, titulada “Evaluación *in vitro* del efecto de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos en la inducción de cortisol y dehidroepiandrosterona”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 09 de agosto del 2023 a las 13:00 hrs. en el Auditorio G203 de la facultad de Ciencias Químicas.

ATENTAMENTE

Dr. Bruno Rivas Santiago
Director de Tesis

Dra. Gabriela Navarro Tovar
Codirectora

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Asesora del PCFB



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas



Título del trabajo

Evaluación *in vitro* del efecto de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos en la inducción de cortisol y dehidroepiandrosterona

Tesis que presenta

González Muñiz Oscar Eduardo

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Jurado

Dr. Diana Patricia Portales Pérez
Presidente del jurado

Dra. Gabriela Navarro Tovar
Secretaria

Dra. Bruno Rivas Santiago
Vocal

San Luis Potosí, SLP, México

Julio, 2023

Evaluación *in vitro* del efecto de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos en la inducción de cortisol y dehidroepiandrosterona

Resumen

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) afectan la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs), cortisol y DHEA, comprometiendo la eliminación del bacilo. Incrementar la inmunidad innata contra Mtb, puede ser una alternativa para tratar la TB. Dado que DHEA incrementa esta respuesta, puede ser un objetivo inducible por fármacos hipoglucemiantes (AHO), como metformina; así como por AMPs: hBDs y LL-37. Evaluamos el efecto de estos compuestos en la síntesis de corticoesteroides. Encontramos que, metformina incrementa la producción de DHEA mientras las hBDs disminuyen la síntesis de cortisol y DHEA. A través de la modulación de corticoesteroides, metformina y los AMPs pueden ser relevantes para la inmunidad innata contra Mtb en la comorbilidad TB/DMT2.

Palabras clave: Respuesta inmunoendocrina, péptidos antimicrobianos, fármacos hipoglucemiantes, DHEA, cortisol

***In vitro* evaluation of oral hypoglycemic agents and antimicrobial peptides effect in the cortisol and dehydroepiandrosterone induction**

Abstract

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), and type 2 diabetes mellitus (T2DM) affect the production of antimicrobial peptides (AMPs), cortisol, and DHEA, compromising the elimination of the bacillus. Increasing innate immunity against Mtb may be an alternative to treating TB. Since DHEA increases this response, it may be an inducible target for oral hypoglycemic agents (OHA), such as metformin; as well as by AMPs: hBDs and LL-37. We evaluated the effect of these compounds on corticosteroid synthesis. We found that metformin increases DHEA production while hBDs decrease cortisol and DHEA synthesis. Through corticosteroid modulation, metformin and MPAs may be relevant to innate immunity against Mtb in TB/T2DM comorbidity

Key words: Immunoendocrine response, antimicrobial peptides, oral hypoglycemic agents, DHEA, cortisol

Índice Contenido	Página
I. Introducción	10
II. Antecedentes	11
II. Justificación	13
III. Hipótesis	13
IV. Objetivo general	14
V. Objetivos específicos	14
VI. Metodología	15
Cultivo de la línea celular adrenal HAC15	15
Condiciones de cultivo celular para los estímulos en la línea celular	15
Extracción de RNA total	17
Síntesis de cDNA	17
Análisis de expresión génica relativa mediante qRT-PCR	18
Evaluación de citotoxicidad celular de fármacos hipoglucemiantes	19
Cuantificación de DHEA y cortisol en sobrenadante de células HAC15	20
Análisis estadístico	22
VII. Resultados	23
Estandarización de forskolina en la inducción de hormonas esteroideas	23
Evaluación del efecto citotóxico de fármacos hipoglucemiantes	24
Efecto de fármacos hipoglucemiantes en la síntesis de cortisol y DHEA	26
Efecto de hBD-3 y LL-37 en la síntesis de cortisol y DHEA	27
Efecto de los fármacos y los péptidos en la expresión de CYP11A1	28
VIII. Discusión	29
IX. Conclusión	36
X. Bibliografía	37
XI. Anexos	43

I. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Hasta la pandemia de coronavirus (COVID-19), la tuberculosis era la principal causa de muerte por un agente infeccioso, por encima del VIH/SIDA. La TB es la decimotercera causa de muerte a nivel mundial con respecto a todas las enfermedades que causan mortalidad y cada año se calcula que enferman más de 10 millones de personas en el mundo [1]. Se estima que un 25% de la población mundial está infectada con Mtb, de los cuales un 10% llega a desarrollar la enfermedad activa. A diferencia de la TB latente, es decir, el estado infeccioso con el bacilo que no presenta ningún síntoma clínico, anomalía radiológica o evidencia microbiológica, la TB activa tiene una mayor carga de bacilos y actúa como fuente de infección para los contactos. Durante la infección activa, las primeras células en mantener contacto con Mtb son las células epiteliales pulmonares (neumocitos tipo II), neutrófilos y macrófagos alveolares. Por tanto, el control eficaz de la infección por Mtb se basa en la respuesta inmune innata a través de la secreción de citocinas y péptidos antimicrobianos (AMPs), así como de la formación de un granuloma para contener o eliminar el bacilo [2].

Cuando la infección y la inflamación se vuelven crónicas, la respuesta inmune innata y la comunicación inmunoendocrina se ven críticamente afectados. El estudio de la interacción bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmunológico muestra que esta interconexión se debe en parte a la actividad estimuladora de las citocinas inflamatorias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), que promueve la secreción de hormonas esteroides, provocando efectos inmunomoduladores relevantes [3]. Por ejemplo, los glucocorticoides (GC) pueden inhibir las respuestas Th1, mientras que su antagonista natural el andrógeno dehidroepiandrosterona (DHEA) puede favorecerlas [3]. En el contexto de la TB, los pacientes que tienen diferentes grados de afectación pulmonar (clasificados de acuerdo con el número de lóbulos pulmonares afectados y cantidad de cavidades generadas) tienen niveles plasmáticos de cortisol elevados, mientras que los valores

de DHEA se encuentran por debajo de los observados en personas sanas, por lo tanto, se tiene una relación cortisol/DHEA alterada [4]. Por otra parte, la enfermedad grave de tuberculosis pulmonar muestra una mayor respuesta con las citocinas Th2, mientras que la producción de citocinas Th1 predomina en los pacientes con enfermedad menos grave (pacientes que no presentan factores de riesgo como diabetes mellitus, VIH-SIDA, tabaquismo, consumo de alcohol o desnutrición) [5, 6]. Con base a esto, se ha demostrado que la DHEA y sus derivados mejoran las respuestas inmunitarias protectoras contra varios patógenos, incluyendo Mtb, no solo favoreciendo las respuestas Th1 de linfocitos T, si no también mediante la estimulación de la respuesta inmune innata principalmente en macrófagos y células dendríticas (DC). Por lo tanto, el uso de este andrógeno podría ser relevante como adyuvante en el tratamiento farmacológico de TB [7, 8] como se propuesto en los estudios *in vitro* y *ex vivo* [7, 8]

Uno de los grupos en riesgo de enfermar de TB es el grupo de pacientes con diabetes mellitus (DM). En el 2019, a nivel mundial, se estimó que poco más del 15 % de las personas con TB tenían diabetes, y en 2020, 370 000 nuevos casos de TB fueron atribuibles a la diabetes [9]. La DM es una enfermedad crónica asociada con niveles altos de glucosa, que se debe a una producción inadecuada de insulina o a una insensibilidad de las células a la acción de esta hormona. Es un problema de salud importante que ha llegado a niveles alarmantes. En 2021, se estimó que más de 500 millones de adultos (20-79 años) tienen diabetes a nivel mundial y se prevé que este número aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045 [10]. Las causas que conllevan a desarrollar TB en pacientes con DM no se conocen por completo, el mal control de la glicemia y un estado de hiperglicemia [11] afecta las respuestas inmunes del huésped. La desregulación de citocinas en personas con DM tipo 2 (DMT2) provoca respuestas inmunes alteradas contra Mtb, resultando en TB activa [12]. En evaluaciones *in vitro* e *in vivo* la hiperglicemia afecta la producción de citocinas y el control de la infección por Mtb, respectivamente [13, 14]. Por lo anterior, resulta relevante la búsqueda del tratamiento más adecuado para la convergencia de estas dos epidemias.

El tratamiento farmacológico inicial para tratar la DMT2 consiste en el uso de agentes hipoglucemiantes orales (AHO). Las cuatro clases principales de AHO son las sulfonilureas, las biguanidas (metformina), las glitazonas (rosiglitazona, pioglitazona) y los inhibidores de la α -glucosidasa (acarbose, miglitol). La metformina se considera el agente de primera línea para el tratamiento de la DMT2 (pacientes obesos), en ausencia de contraindicaciones. Las sulfonilureas de segunda generación como glibenclamida suelen ser un tratamiento clásico de primera o segunda línea en pacientes no obesos. La metformina y la glibenclamida se usan con frecuencia en combinación en pacientes con DMT2, siendo más efectivos que si se administran en monoterapia [15]. La metformina es de especial interés, dada su capacidad para favorecer la inmunidad innata. Por ejemplo, en neumocitos tipo II (NTII) y macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDM) el tratamiento con metformina a concentraciones terapéuticas (4 mM) indujo la producción de AMPs, de la familia de las beta defensinas humanas (hBD-2/3/4) y redujo el crecimiento de Mtb (pero no tuvo efectos discernibles sobre la catelicidina LL-37) [16], efecto que, se propone, depende de Proteína Kinasa activada por AMP (AMPK) [17]. Por otra parte, en modelos de ratones con TB aguda y crónica, el tratamiento con metformina redujo la patología del tejido pulmonar (proporciones de áreas pulmonares menos afectadas) y mejoró la respuesta inmune protectora (menores cargas bacilares en pulmón y bazo). En cuanto a los datos clínicos, aunque de naturaleza retrospectiva, el tratamiento con metformina se correlaciona con un menor riesgo de TB [18].

II. Antecedentes

Dado que la metformina se prescribe e investiga principalmente como fármaco hipoglucemiante, su efecto sobre la síntesis de corticoesteroides y los mecanismos relacionados no está claro. Existen reportes de que el tratamiento con metformina durante un año en pacientes prediabéticos, incrementa los niveles del metabolito sulfatado de DHEA (DHEA-S), y no modifica los niveles de cortisol [40]. Por lo que existe un efecto de esta biguanida a nivel del eje HPA, sin embargo, sigue sin

esclarecerse como puede modular la síntesis de corticoesteroides. Además, hasta la fecha, no hay suficientes reportes que relacionen la interacción entre AHO-corticoesteroides y AMPs-corticoesteroides *in vitro*. Por lo tanto, en este trabajo se analizó el efecto de fármacos hipoglucemiantes, incluidos metformina, glibenclamida e insulina en la producción de cortisol y DHEA en un modelo celular. Asimismo, dado que metformina induce la producción de hBDs en macrófagos infectados con Mtb, y que se ha reportado que los AMPs pueden afectar la producción de hormonas [56], se evaluó si en nuestro modelo *in vitro* la hBD-3 y LL-37 regulan cortisol y DHEA.

III. Justificación

Dentro del sistema inmunológico, la respuesta inmune innata que se genera contra Mtb se ve fuertemente comprometida durante la comorbilidad TB/DMT2. Por lo tanto, los esfuerzos pueden dirigirse al huésped, es decir, encontrar fármacos que puedan estimular células de la inmunidad innata y que además tengan la capacidad de modular la producción de sustancias endógenas que potencien la actividad de estas células. El presente trabajo está enfocado en este último punto; la búsqueda de compuestos que favorezcan la inducción y modulación de sustancias endógenas de naturaleza esteroidea. Debido a su efecto sobre células del sistema inmune innato, la DHEA es un candidato especial para ser inducido por terapia farmacológica establecida en la DMT2, como lo es metformina, glibenclamida e insulina, así como moléculas efectoras de la inmunidad innata, tales como hBD y la catelicidina humana LL-37. Las evidencias *in vitro* relacionadas con los efectos endocrinos de fármacos hipoglucemiantes y péptidos antimicrobianos puede apuntar a una terapia más efectiva de la comorbilidad TB / DMT2.

IV. Hipótesis

Los fármacos hipoglucemiantes metformina, glibenclamida y la insulina, así como los péptidos antimicrobianos hBD-3 y LL-37 tienen la capacidad de regular la producción de DHEA y cortisol en una línea celular adrenal.

V. Objetivo general

Evaluar en células adrenales el efecto potencial de los fármacos hipoglucemiantes y de péptidos antimicrobianos en la producción de DHEA y cortisol en un modelo *in vitro*.

VI. Objetivos específicos

1. Estandarizar *in vitro* un agonista de la vía de señalización del cAMP (Forskolina) para la producción de hormonas esteroideas en la línea celular adrenal HAC15.
2. Determinar si los fármacos hipoglucemiantes, a concentraciones terapéuticas reportadas en la bibliografía, son citotóxicos en las células adrenales HAC15.
3. Determinar si los fármacos hipoglucemiantes y los AMPs inducen la producción del andrógeno DHEA y si regulan la producción de cortisol en la línea celular HAC15.

VII. Metodología

Cultivo de la línea celular adrenal HAC15

La línea celular HAC15 (American Tissue Type Collection, ATCC® CRL-3301™) se cultivó en botellas con área de cultivo de 25 cm² (Corning, NY, EUA) con medio de cultivo completo Eagle modificado de Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12 Gibco®) suplementado al 10% con suero fetal bovino fortificado con hierro (SFB cósmico; ATCC 30-2030™ Manassas, VA, EUA) + 1% de Suplemento de cultivo universal (ITS Corning®, MA, USA) + 100 µg/ml de penicilina (100X, Corning Cellgro, Manassas, VA, EUA) + L-glutamina 2 mM (200 mM Corning Cellgro, Manassas, VA, EUA). Las células se incubaron a 37° C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia 80-85%, en ese momento se realizó subcultivo de la línea mediante una disgregación enzimática con tripsina-EDTA (Corning Cellgro, Manassas, VA, EUA). Se cuantificaron las células en cámara de Neubauer, y se determinó la viabilidad celular con la tinción de azul de tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron disgregadas y adheridas en placas.

Condiciones de cultivo celular para los estímulos en la línea celular

Estandarización de forskolina

Las células se adhirieron en placa de 12 pozos al 1% de SFB cósmico (Corning, NY, EUA) durante 1 día (400,00 células/pozo). Posteriormente se estimularon por 24 horas con 10, 25 y 50 µM de forskolina (Tocris Bioscience, UK, EUA). A continuación, los sobrenadantes y las muestras de TRIzol, para extracción de RNA total de las células, se recogieron y almacenaron a -70 °C en tubos eppendorf de 1.5 mL y 0.6 mL respectivamente (Axygen Scientific, Union, CA, EUA) hasta su procesamiento.

Ensayo de citotoxicidad celular por citometría de flujo

Para la evaluación del efecto citotóxico de los fármacos hipoglucemiantes, se utilizaron dos concentraciones de cada sustancia; metformina a una concentración de 2 y 4 mM, glibenclamida 1 y 5 μM e insulina 1×10^{-7} y 1×10^{-6} M (Sigma, St. Louis, EUA). Se adherieron 50,000 células por pozo en placas de 48 pozos al 1% de SFB fortificado con hierro (Corning, NY, USA) durante 1 día y posteriormente fueron estimuladas durante 24 horas con cada fármaco, DMSO al 10% como control positivo de muerte y DMEM/F-12 como control negativo.

Evaluación del efecto endocrino de los fármacos hipoglucemiantes

Se adherieron 300,000 células por pozo en placas de 24 pozos (Corning, NY, EUA) al 1% de SFB fortificado con hierro. Los estímulos se realizaron durante 24 horas con fármacos hipoglucemiantes, forskolina 10 μM (control positivo) y se usó únicamente DMEM/F-12 como control negativo. Posteriormente, se recolectaron los sobrenadantes en tubos eppendorf de 1.5 mL y fueron inmediatamente procesados. Las muestras de TRIzol se almacenaron a -70°C en tubos eppendorf de 0.6 mL hasta su procesamiento. Las concentraciones utilizadas de los fármacos, fueron las descritas anteriormente en el ensayo de citotoxicidad.

Evaluación del efecto endocrino de hBD-3 y LL-37

Las células fueron estimuladas con péptidos recombinantes que se tomaron de un kit para cuantificación de péptidos: Human BD-3 Standard ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, UK, USA). El péptido consistía en 1 μg de hBD-3 recombinante humana + 2.2 mg BSA + 11.0 mg D-manitol y fue reconstituido en un 1 mL de agua estéril obteniendo una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de la cual se realizaron las concentraciones de trabajo (100 y 500 ng/mL). Para el caso de LL-37, se usó *LL-37 stock solution 1 mg/mL* (InvivoGen, San Diego California, EUA) al péptido liofilizado (1 mg) se le agregó 1 mL de *endotoxin-free water*, se homogeneizó en vórtex hasta

disolver y se almacenó en alícuotas a – 20 °C. A partir de este stock se preparó el estímulo a una concentración de 5 µg/mL.

Extracción de RNA total

Una vez que se completó el tiempo de cada tratamiento se recolectó el sobrenadante y se colocó 200 µL/pozo de TRIzol (Invitrogen, Auckland Nueva Zelanda). Se dejó reposar 5 minutos y los lisados se recolectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL (AxygenScientific, Union, CA, USA) y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Los tubos se homogenizaron en vórtex y se mantuvieron por 5 minutos a temperatura ambiente. La extracción de RNA total se realizó por el método de cloroformo: alcohol isoamílico, el cual consistió en agregar a cada muestra 40µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Después, las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron 20 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se añadió 50 µL de isopropanol frío (Sigma Aldrich, Missouri, EUA). Se dejó precipitar a -70°C por una hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 16 minutos a 13,000 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregó 200 µL de etanol frío al 75% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Inmediatamente las muestras se centrifugaron 16 minutos a 13,000 rpm a 4°C y nuevamente se retiró el sobrenadante. Las muestras se colocaron en Speed Vac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, USA) por 15 minutos a una velocidad media de drenado para eliminar los remanentes de etanol. Finalmente, el RNA obtenido se resuspendió en 11µL de agua dietilpirocarbonato (DEPC) para continuar con la síntesis de cDNA.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el termociclador Applied-Biosystems siguiendo las especificaciones de la enzima utilizada. En tubos eppenforf de 200 µL (AxygenScientific, Union, CA, USA) se agregó 0.5 mL de Oligo-DT (ThermoFisher Scientific, Lithuania, EU) y los 11 µL de RNA previamente extraído. Las muestras se colocaron en el termociclador y se incubaron un ciclo de 10 minutos a 72°C seguido de 5 min a 4°C, tiempo en el que se añadió 6 µL/muestra de la siguiente mezcla de

reacción; buffer 5x (Thermo Fisher Scientific, Lithuania, EU) 3 μ L/reacción, dNTPs 10 mM (Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) 1 μ L/reacción y DTT 0.1M (Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) 2 μ L/reacción. Las muestras se homogenizaron e incubaron en el termociclador un ciclo a 25°C por 5 minutos, seguido de otro ciclo a 4°C donde se agregó 0.5 μ L/muestra de la enzima transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific, Lithuania, EU). Después de esto las muestras se incubaron un ciclo a 42°C por 50 minutos y un ciclo de 70°C durante 15 minutos. El cDNA se cuantificó en el NanoDrop® ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc, EUA). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 260 nm para determinar la concentración en ng/mL. A partir de las concentraciones de cada muestra, se realizaron alícuotas de trabajo de 80 μ L a una concentración de 75 ng/ μ L, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Análisis de expresión génica relativa mediante qRT-PCR

Se evaluó la expresión de dos enzimas implicadas en la biosíntesis de hormonas esteroideas, CYP11A1 y CYP11B2, y como gen constitutivo se usó HPRT. Para la amplificación de los genes de las enzimas antes mencionadas, se utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR MM (Thermo Fisher Scientific, Lithuania, EUA) y primers específicos, mostrados en la tabla 2, que fueron diseñados en Universal Probe-Library Assay Design Center de Roche. La mezcla de reacción para las amplificaciones se preparó de la siguiente manera: Watter nuclease free (Thermo Fisher Scientific Lithuania, USA) 2.5 μ L/reacción, primer reverse y forward 0.25 μ L/reacción de cada uno y ROX master mix 5 μ L/reacción. La amplificación del cDNA de cada muestra se realizó por duplicado en placas de 96 pozos (Roche LifeScience, USA), se colocaron 8 μ L de la mezcla de reacción y 2 μ L de cDNA por pozo, a excepción del control negativo donde se colocó 2 μ L de Watter nuclease free. Una vez que las placas fueron cargadas, éstas fueron selladas y centrifugadas a 1200 rpm por 1 minuto. Las placas se colocaron en el termociclador Lightcycler® 480 (Roche Life Science, USA). El análisis de las curvas de amplificación para la determinación de los puntos de cruzamiento se llevó a cabo en el software

Lightcycler 4.05 (Roche Applied Science) del mismo termociclador. Finalmente se realizó la normalización de los datos obtenidos de tres experimentos independientes por duplicado con base al gen constitutivo HPRT. Posteriormente, se determinó la expresión relativa a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, seguido de su análisis estadístico correspondiente.

Evaluación de citotoxicidad celular mediante el reactivo Guava ViaCount

Millipore® y citometría de flujo

Para la evaluación de la citotoxicidad de los fármacos se utilizó el reactivo Guava ViaCount Millipore® (Billerica, MA, EUA. Este reactivo distingue las células viables de las no viables en función de las permeabilidades diferenciales de dos colorantes de unión al DNA. El fluorocromo nuclear tiñe solo las células nucleadas, mientras que el fluorocromo de viabilidad tiñe brillantemente las células muertas. Esta combinación de fluorocromos permite que el ensayo Guava ViaCount distinga células vivas, en proceso de apoptosis y muertas. Pasadas las 24 horas de estímulo, se obtuvieron los sobrenadantes y se colocaron en tubos para citometría con el objetivo de considerar las células desprendidas y muertas. Se agregó a los pozos 100 μ L de tripsina-EDTA y se incubó de 3-5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez disgregadas las células, se agregaron 100 μ L de medio completo con SFB a cada pozo para inactivar la tripsina-EDTA y se colectó toda la suspensión celular para colocarla en tubos para citometría los cuales se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 100 μ L del reactivo Guava ViaCount a cada muestra, e inmediatamente fueron analizadas por citometría de flujo (BD FACSCanto™ II Cell Analyzer | BD Biosciences-USA).

Cuantificación de DHEA y cortisol en sobrenadante de células HAC15

El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. El Kit Cortisol o DHEA ELISA (DRG, NJ. USA) es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción ligado a enzimas, basado en el principio de unión competitiva. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra una región antigénica en la molécula cortisol o DHEA. Durante la reacción el cortisol o DHEA de los sobrenadantes competirán con un conjugado cortisol-peroxidasa o DHEA-peroxidasa en la unión al anticuerpo inmovilizado; la cantidad de conjugado esteroide-peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de esteroide en el sobrenadante (figura suplementaria 1). Se aseguró el número deseado de pocillos en el recipiente y se dispensaron 20 μL de cada estándar y muestras por duplicados para el ensayo del cortisol, y 10 μL para el ensayo de DHEA. Enseguida, se colocaron 200 μL del conjugado a cada pocillo y se mezcló durante 10 segundos y posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron los pocillos 3 veces para cortisol y 4 veces para DHEA con solución de lavado diluida (400 μL por pocillo). Enseguida, se adicionaron 100 μL de solución de sustrato (tetrametilbencidina) a cada pocillo. Después, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción enzimática se agregaron 100 μL de *stop solution* (H_2SO_4 0.5 M) a cada pocillo. Finalmente, se leyó la densidad óptica (OD) a 450 ± 10 nm con un lector ELISA de microplacas. Se calcularon los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares y muestras de sobrenadante. Se utilizó el valor de absorbancia media de cada muestra para determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.

HPRT (Hipopoxantina guanina fosforribosiltransferasa)	
Primer reverse	5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'
Primer forward	5'-TGACCTTGATTATTTGCATACC-3'
CYP11A1 (Enzima citocromo p450 11A1)	
Primer reverse	5'-TTGCGTGCCATCTCATACA-3'
Primer forward	5'-AGGAGGGGTGGACACGAC-3'
CYP11B2 (Enzima citocromo p450 11B2)	
Primer reverse	5'-CTCTTCAGGGCGGGTTCT-3'
Primer forward	5'-CTGGATGATGCTGAGGTGTG-3'

Tabla 1. Primers utilizados para evaluar la expresión del gen constitutivo HPRT y los genes de interés CYP11A1 y CYP11B2. En la tabla se indica la proteína a la cual codifica cada gen, así como la secuencia de los primers reverse y forward

DHEA	
Estándar	Concentración (ng/mL)
1	0.0
2	0.37
3	1.10
4	3.30
5	10.0
6	30.0
Cortisol	
1	0.0
2	20
3	50
4	100
5	200
6	400
7	800

Tabla 2. Estándares de calibración de cortisol y DHEA proporcionados por el kit ELISA (DRG, NJ. USA)

Análisis estadístico

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

VIII. Resultados

Estandarización de forskolina en la inducción de hormonas esteroideas

Se estandarizaron tres concentraciones de forskolina, el cual es un labdano diterpeno que proviene de la planta *Coleus forskohlii*. Esta molécula es inductora de esteroides e induce la expresión génica y proteica de la mayoría de las enzimas implicadas en la biosíntesis de corticoesteroides, incluidas CYP11A1 y CYP11B2. Además, es un potente inductor de cortisol y DHEA [19, 20]. La concentración más utilizada para la inducción de la expresión génica y proteica de enzimas CYP es 10 μM [19], sin embargo, también se utilizó 25 y 50 μM como concentración media y alta respectivamente, con el fin de evaluar si la expresión depende de la concentración. Solo la concentración 10 μM indujo significativamente la expresión de ambas enzimas evaluadas CYP11A1 ($p = 0.0022$) (**Figura 1A**) y CYP11B2 ($p = 0.0018$) (**Figura 1B**), y al parecer, con una relación inversamente proporcional a la concentración de forskolina.

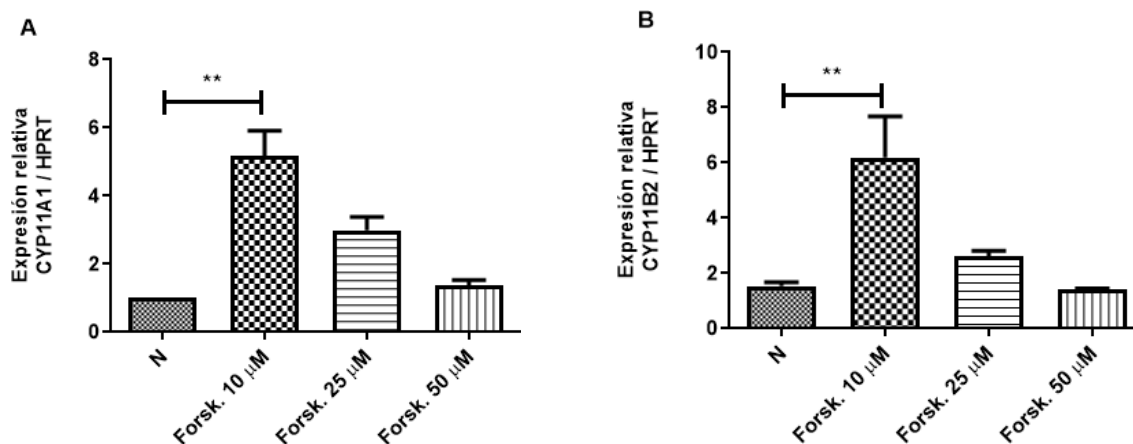
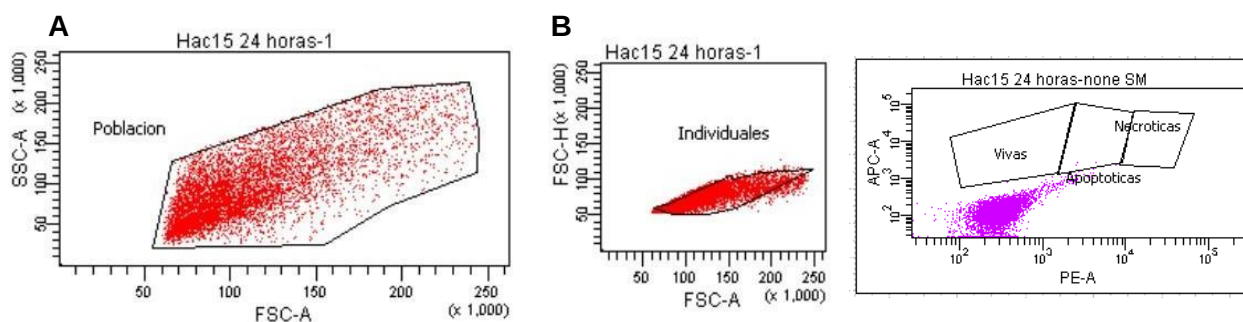


Figura 1. Forskolina 10 μM induce la expresión de las enzimas CYP11A1 y CYP11B2. La línea celular HAC15 fue estimulada por 24 horas con tres diferentes concentraciones de forskolina o sin estímulo (N). Se muestra la expresión relativa de CYP11A1 y CYP11B2 con respecto al gen constitutivo HPRT de cinco experimentos independientes por duplicado, indicando la media $\pm$ DE. (**) $p < 0.01$.

Evaluación del efecto citotóxico de fármacos hipoglucemiantes

Metformina, glibenclamida e insulina son tres fármacos ampliamente usados para reducir los niveles de glucosa en sangre (hipoglucemiantes). Estos tres AHO están aprobados por la FDA para su uso en pacientes con DMT2 [21]; sin embargo, siempre que se pretendan usar en un modelo celular, deben verificarse para evaluar su efecto citotóxico. Se usaron dos concentraciones diferentes de cada fármaco, en base a lo reportado en la literatura con respecto a las concentraciones que muestran el efecto terapéutico de metformina [22, 23], glibenclamida [24, 25] e insulina [26, 27]. En la figura 2A se muestra la plantilla diseñada para el reactivo Guava ViaCount Millipore® se visualiza la población de células, luego se hizo la lectura de aquellos eventos individuales. En la figura 2B, se muestran las células sin teñir, dado que uno de los colorantes del reactivo tiñe las células nucleadas, no se muestra ningún evento dentro del área de células vivas (panel izquierdo dentro del dot plot). En la figura 2C, se muestran células sin estímulo (none) teñidas con el reactivo; células vivas (verde) células apoptóticas (rosa), células muertas (azul). En el gráfico 2C, se observan dot plots de viabilidad representativo para Metformina, Glibenclamida (gráfico 2E), e Insulina (gráfico 2F) . En la figura G, se muestra el porcentaje de viabilidad de células adrenales estimuladas con los AHO, se usó DMSO 10% como control de muerte. Los resultados muestran que los fármacos no afectan el porcentaje de viabilidad de las células adrenales después de un estímulo de 24 horas.



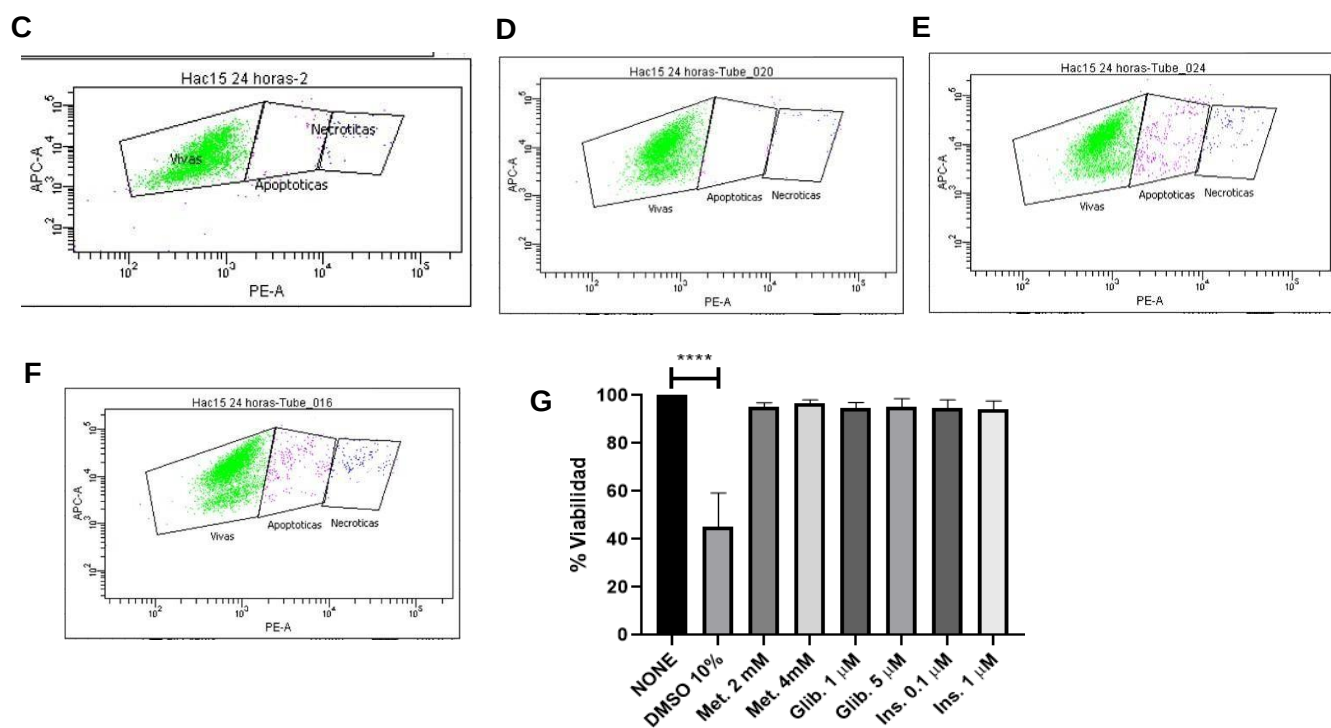


Figura 2. Metformina, glibenclamida e insulina no muestran citotoxicidad en células adrenales

La línea celular HAC15 fue estimulada por 24 horas con los AHO y después teñidas con el reactivo Guava ViaCount Millipore®, se muestran dot plots representativos. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes por duplicado, indicando la media $\pm$ DE. (****) $p < 0.0001$.

Efecto de fármacos hipoglucemiantes sobre la síntesis de cortisol y DHEA

Para la cuantificación de cortisol y DHEA se utilizó un kit comercial ELISA para la cuantificación de ambas hormonas esteroideas. Las células fueron estimuladas por 24 horas con dos concentraciones de cada fármaco como se comentó anteriormente. Los resultados muestran que forskolin (10 μ M) es un potente inductor de DHEA y cortisol en la línea celular HAC15 (**Figura 3**). Por otra parte, Metformina tiene una ligera tendencia a incrementar la producción de cortisol a la concentración de 4 mM, sin embargo, no es significativo. En cambio, glibenclamida muestra el mismo patrón, pero a la concentración de 1 μ M sin llegar a hacer significativo. En cuanto a la insulina la concentración 1×10^{-7} M tiene una pequeña tendencia, no significativa, a disminuir la síntesis de cortisol. Para los resultados del andrógeno DHEA, el fármaco metformina induce la producción de esta hormona con las dos concentraciones utilizadas, 2 mM ($p = 0.0081$) y 4 mM ($p < 0.0001$) con respecto a la condición sin estímulo. En cuanto a los otros fármacos no hubo efecto estadísticamente significativo para la producción de DHEA; sin embargo, glibenclamida 1 μ M tiene un efecto positivo para la producción de esta hormona (**Figura 3**).

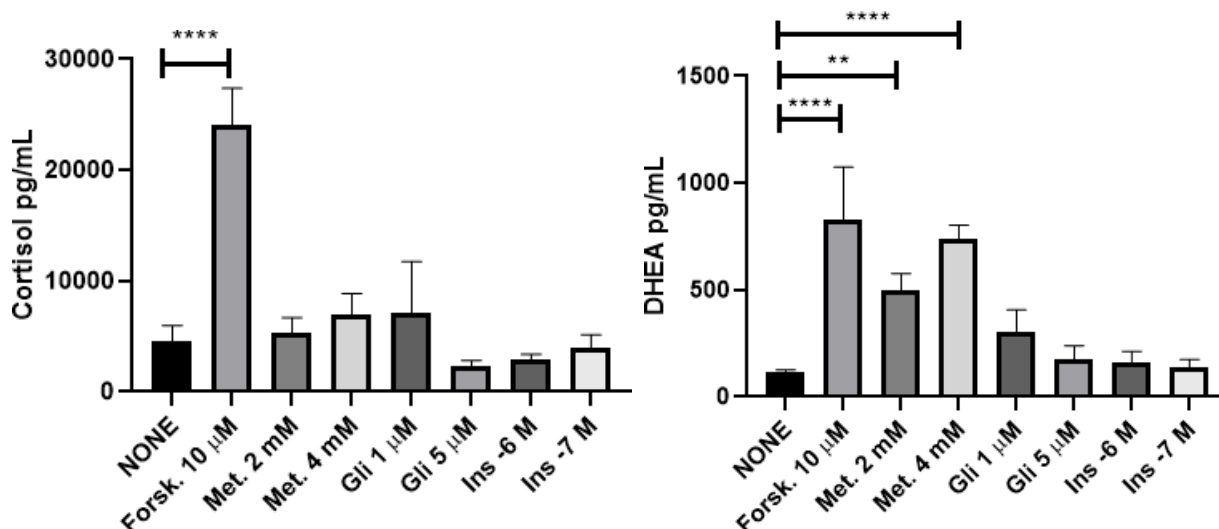


Figura 3. Metformina incrementa las concentraciones de DHEA, pero no modifica los niveles de cortisol. Las células fueron estimuladas por 24 horas con cada fármaco y en los sobrenadantes se evaluó los niveles de las hormonas mediante ELISA. Se muestran las concentraciones de los esteroides en pg/mL y las comparaciones con respecto a la condición sin estímulo (NONE) para tres experimentos independientes por duplicado, Met; metformina, Gli; glibenclamida, Ins; insulina. En la gráfica se indica la media $\pm$ DE. (**) $p < 0.01$, (****) $p < 0.0001$.

Efecto de hBD-3 y LL-37 en la síntesis de cortisol y DHEA

Se utilizó una concentración de 5 μ g/mL de LL-37, ya que ha esta concentración muestra un efecto bactericida contra Mtb [28], y se busca que a las mismas concentraciones pueda mostrar algún efecto endocrino. Para el caso de las defensinas, se ha reportado que las concentraciones de 0.1 y 0.5 μ g/mL comienzan a tener un efecto bactericida contra una amplia gama de bacterias patógenas [29]. Por tanto, se utilizaron estas concentraciones para estimular a las células. Los resultados muestran que las tres concentraciones de los dos péptidos; LL-37 a 5 μ g/mL y hBD-3 100 y 500 ng/mL reducen las concentraciones de cortisol. Pero solo LL-37 y hBD-3 500 ng/mL lo hacen de manera significativa $p=0.022$ y $p=0.041$ respectivamente. En cuanto a DHEA, las dos concentraciones de la defensina disminuyen los niveles de DHEA (100 ng/mL; $p=0.0096$ y 500 ng/mL, $p=0.02$). Teniendo más efecto la concentración mínima. Interesantemente, LL-37 no disminuye la concentración del andrógeno, incluso tiene una tendencia a incrementarla.

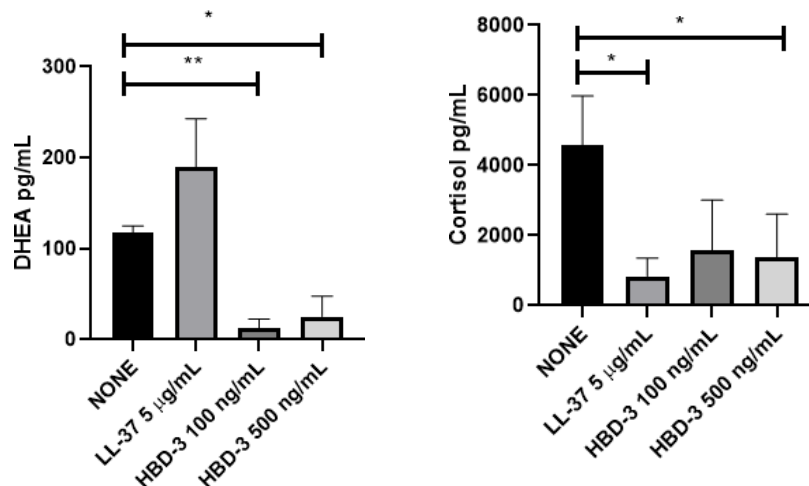


Figura 4. hBD-3 disminuye la síntesis de cortisol y DHEA, en cambio LL-37 disminuye la producción de cortisol y no modifica los niveles de DHEA. Las células fueron estimuladas por 24 horas con cada péptido y se recogió el sobrenadante para medir los niveles de las hormonas mediante ELISA. Se muestran las concentraciones de los esteroides en pg/mL y las comparaciones con respecto a la condición sin estímulo (NONE) para tres experimentos independientes por duplicado. hBD-3; beta defensina humana 3. En la gráfica se indica la media $\pm$ DE. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Efecto de los fármacos y los péptidos antimicrobianos en la expresión de CYP11A1

Se evaluó el efecto de los fármacos y los péptidos antimicrobianos sobre la expresión génica de la enzima CYP11A1, la cual está implicada en la generación de pregnenolona (metabolito precursor de todos los corticoesteroides) a partir de colesterol. No se evaluó la expresión de CYP11B2, dado que esta enzima únicamente participa en los últimos dos pasos para la síntesis final de aldosterona, y no llega a influir en la síntesis de cortisol o DHEA. De los fármacos hipoglucemiantes, metformina 4 Mm y glibenclamida 5 μ M indujeron significativamente la expresión de la enzima ($p = 0.004$ y $p = 0.035$ respectivamente). Mientras que insulina no tuvo ningún efecto. En cuanto a los péptidos, únicamente LL-37 aumento la expresión génica de CYP11A1 ($p = 0.005$) mientras de que las defensinas no tuvieron efecto.

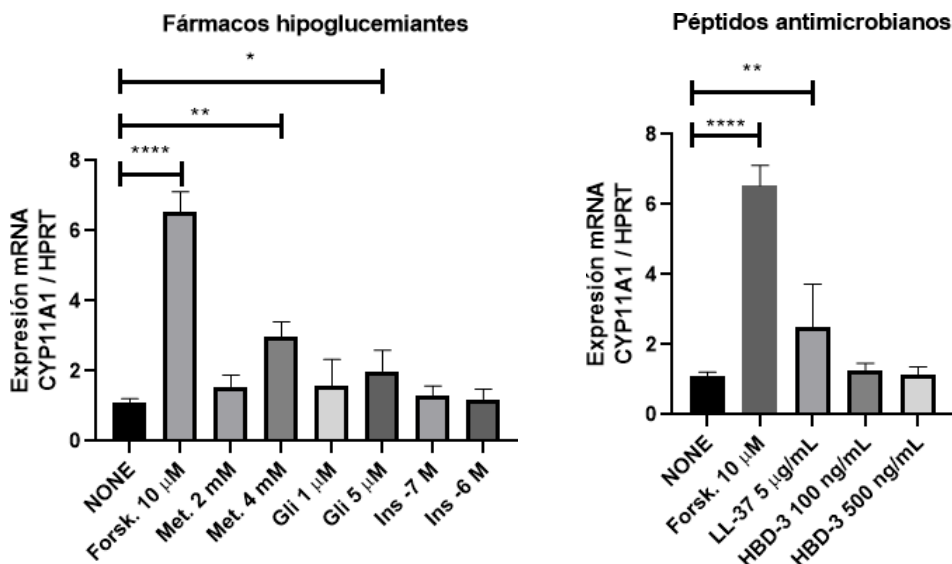


Figura 5. Metformina, glibenclamida y LL-37 incrementan la expresión de CYP11A1. Las células fueron estimuladas con cada fármaco o péptido y forskolina como control positivo durante 24 horas. Se muestra la expresión relativa de CYP11A1 con respecto al gen constitutivo HPRT. Met; metformina, Gli; glibenclamida, Ins; insulina, hBD-3; beta defensina humana 3. En la gráfica se indica la media $\pm$ DE. (**) $p < 0.01$, (****) $p < 0.0001$.

IX. Discusión

La diabetes mellitus ocupa el top 5 como factor de riesgo de desarrollar TB activa a nivel mundial. Si se padece DMT2, el riesgo de desarrollar TB activa es de 2-3 veces, por lo que la asociación entre ambas enfermedades es evidente. Aunado a esto, la DMT2 y la aparición de cepas de Mtb multifármacoresistentes dificulta el éxito de la terapia contra la TB [34], por lo que proponer nuevas terapias es una necesidad emergente ante la aparición de estas cepas y la alta incidencia de DMT2. Una estrategia muy prometedora, es la de incrementar los mecanismos de defensa contra Mtb (en los pacientes con TB o TB / DMT2) potenciando el sistema inmunológico (terapia dirigida al huésped). Considerando que, dentro del sistema inmunológico, la inmunidad innata es la primera línea de defensa contra agentes patógenos, es a donde deben dirigirse los esfuerzos para eliminar Mtb y evitar el desarrollo de TB activa. Dentro de la respuesta inmune innata destacan la función de células epiteliales alveolares, neutrófilos y macrófagos las cuales son las primeras células en

establecer contacto con Mtb y establecer una respuesta inmune inicial: fagocitosis de Mtb, secreción de citocinas, generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como la producción de péptidos antimicrobianos como hBDs y la catelicidina LL-37 [2]. En este sentido, la investigación de fármacos que puedan modular la inmunidad innata para acompañar la terapia contra TB es importante, y ha ido en aumento, tal es el caso de la metformina, las estatinas y el verapamilo [17]. Para casualidad de la comunidad clínica que maneja la comorbilidad TB/DM, metformina es de los fármacos más estudiados para potenciar esta respuesta [17]. Por esa razón enfocamos nuestra atención en metformina y otros dos hipoglucemiantes (glibenclamida e insulina). Sin embargo, el objetivo de la investigación no se enfocó en el efecto de los fármacos sobre células de la inmunidad innata, sino en su efecto en la modulación de hormonas corticoesteroides: cortisol y DHEA. Se sabe que estas y otras hormonas esteroideas se desregulan en el curso de la TB, teniendo altos niveles de cortisol y bajas concentraciones de DHEA lo que se relaciona con la gravedad de la enfermedad [4]. Además, estudios *in vivo* e *in vitro*, muestran que el cortisol afecta la función y actividad de la inmunidad innata y la respuesta Th1 (importante para mediar la eliminación de Mtb en una infección temprana) mientras que DHEA favorece estas dos respuestas [8, 35, 36]. Dado el historial de investigación de DHEA en la inducción de la inmunidad innata durante la infección por Mtb, se vuelve un objetivo para ser inducido por el tratamiento farmacológico establecido en la DM: Metformina, glibenclamida e insulina. Por estas razones se evaluó el efecto endocrino de los fármacos hipoglucemiantes sobre un modelo de células adrenales (HAC15). Primeramente, estandarizamos forskolina, la cual actúa activando adenilato ciclasa (AC) incrementando los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) lo que lleva a la activación de la proteína kinasa A (PKA) que media la activación de factores de transcripción claves para síntesis de enzimas CYP. Para la estandarización evaluamos la expresión de CYP11A1, enzima implicada en la síntesis de pregnenolona (precursor de los esteroides adrenales), y CYP11B2, el cual media los últimos dos pasos para la síntesis de aldosterona. Los reportes indican que forskolina 10 μ M es suficiente para

inducir la síntesis de esteroides y la expresión de enzimas adrenales [19, 37]. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado y además observamos que la expresión de las enzimas CYP es inversamente proporcional a la concentración. Actualmente, no se ha reportado el efecto de concentraciones mayores de 10 μ M sobre la expresión génica de estas enzimas. No obstante, un estudio reciente encontró que estimular la línea HAC15 con 100 y 250 μ M de forskolina disminuye la síntesis de esteroides (cortisol y aldosterona) [20]. Entonces puede sugerirse que, para la inhibición de las hormonas, debe haber poca expresión de enzimas CYP. Por lo tanto, es plausible que el estímulo con altas concentraciones de forskolina, lleve a niveles elevados de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), el cual podría ser inactivado, al interior de la célula adrenal, por la acción de fosfodiesterasas (PDE), provocando el bloqueo en la expresión de enzimas CYP [38].

Así como forskolina 10 μ M indujo la expresión de las enzimas CYP, la misma concentración fue suficiente para promover la síntesis de cortisol y DHEA en nuestra línea celular, como se ha reportado en otros trabajos [20, 39]. En cuanto a los AHO, antes de evaluar su efecto endocrino, analizamos su efecto citotóxico. Encontramos que los fármacos no modifican la viabilidad de las células. Por lo tanto, procedimos a evaluar su efecto endocrino. En primer lugar, observamos que ninguno de los tres fármacos modificó la síntesis de cortisol con respecto a la condición sin estímulo. En el caso de metformina, se ha reportado que, en un rango de concentración de 0.01-5 mM, este fármaco no modifica la producción de cortisol en la línea celular adrenal NCI-H295R (un modelo establecido de esteroidegénesis), y que la síntesis de estos esteroides disminuye a partir de la concentración de 10 mM de metformina. Dado que HAC15 deriva de esta línea celular, especulamos que el efecto podría ser similar [57]. Aunado a esto, los ensayos clínicos muestran que el tratamiento con metformina durante 4 y 12 meses en pacientes prediabéticos, no modifica los niveles de cortisol en plasma con respecto a las concentraciones basales antes del tratamiento [40, 41]. Sin embargo, esto no significa que metformina no actúe en otro punto del eje HPA. De hecho, hay datos que muestran que una sola dosis oral de metformina disminuye el cortisol, ACTH y glucosa en orina de voluntarios sanos con

respecto a las concentraciones antes de la administración [42]. Además, metformina puede atravesar rápidamente la barrera hematoencefálica y acumularse en la pituitaria de ratas, disminuyendo la expresión proteica de ACTH, y llevando a la disminución de cortisol y glucosa en el plasma de los roedores [42]. Por lo tanto, metformina tiene un efecto directo sobre la síntesis de cortisol en las células adrenales, y puede llegar a modular la síntesis de sus inductores. Para el caso de la glibenclamida, es de especial interés que, al comparar las concentraciones 1 y 5 μM , esta última disminuye la síntesis de cortisol (**Figura 3**), y a pesar de que no es significativo, puede ser un mecanismo por el cual glibenclamida pueda mitigar los niveles de glucosa en sangre, ya que es bien sabido el efecto gluconeogénico del cortisol [43]. En este sentido, se ha observado que la administración oral de sulfonilureas, incluida la glibenclamida, disminuyen los niveles de cortisol y glucosa, durante un estado agudo de hipoglucemia inducido en pacientes sanos [44]. Por lo que, aparte de su ya conocido efecto secretor de insulina, la glibenclamida y otras sulfonilureas podrían modular la síntesis de cortisol para evitar la gluconeogénesis durante la terapia para disminuir los niveles de glucosa. Cabe mencionar, que a pesar de que glibenclamida es una de las sulfonilureas de mayor prescripción médica para reducir los niveles de glucosa [21], tiene alto riesgo de episodios prolongados de hipoglucemia [45]. Aunque esto solo se ha observado con altas dosis iniciales de glibenclamida (>15 mg) y en pacientes recién diagnosticados de DMT2, especialmente adultos mayores de 65 años [46]. Por lo que la Sociedad Americana de Geriátría lo ha catalogado como medicamento potencialmente inapropiado en este grupo etario [47]. Sin embargo, la glibenclamida sigue siendo prescrita en nuestro país, y es un medicamento aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) para tratar la DMT2 [21]. Por lo que su uso debe ser de manera racional y con un tratamiento inicial seguro. Por otro lado, observamos que la insulina no modifica los niveles de cortisol, lo cual es un resultado deseado esperado, ya que durante el curso de la DMT2 existe resistencia a la insulina que es causada en gran medida por la exposición crónica de cortisol [48]. Incluso los pacientes con DM tipo I, que son insulín dependientes, tienen bajas concentraciones de cortisol y de metabolitos de

naturaleza glucocorticoide, en comparación con controles sanos [49]. Para el caso del efecto de los hipoglucemiantes sobre DHEA, solo metformina indujo la síntesis de este andrógeno a las dos concentraciones utilizadas (2 y 4 mM), siendo más significativa la concentración más alta (**Figura 3**). *In vitro* se ha demostrado que, en la línea NCI-H295R, el estímulo con metformina (5 mM) regula al alza la síntesis de pregnenolona, DHEA y su metabolito precursor 17-OH-pregnenolona. Sin embargo, si la concentración incrementa a 10 mM, disminuye la síntesis de los andrógenos; incluso a esta concentración metformina disminuye la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de andrógenos: 17 α -Hidroxilasa/17,20 liasa (CYP17A1) y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD3B2), por lo que existe efectos distintos a diferentes concentraciones [50]. La mayoría de los efectos de metformina son mediados por señalización de la Proteína Kinasa activada por AMP (AMPK) [51]. Sin embargo, en células adrenales, la síntesis de andrógenos puede ser independiente o dependiente de AMPK, elevando los niveles de CYP17A1 (cuando se requiere AMPK) [52]. Además, es necesaria la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial para que metformina (10 mM) pueda disminuir la síntesis de andrógenos [50]. Es importante mencionar, que las células adrenales necesitan una sobreexpresión de transportadores de cationes orgánicos (OCT), los cuales median la entrada de metformina a las células, para que el fármaco pueda modular la síntesis de los andrógenos de manera más potente [50]. Incluso, está reportado que metformina puede modular las vías metabólicas mitocondriales en células adrenales, lo que lleva a disminuir la biosíntesis de colesterol que es importante para toda la esteroideogénesis [53]. Dado que la línea HAC15 deriva de NCI-H295R, y ambas tienen el mismo perfil genómico y metabólico para la síntesis de esteroides y enzimas CYP [19, 54], es muy probable que metformina tenga el mismo efecto sobre HAC15, incluso encontramos que metformina 4 mM induce la expresión génica de CYP11A1 con respecto a la condición sin estímulo (**figura 5**). Además, los análisis por Microrrays revelan cambios en más de 690 genes (incluidos 12 genes implicados en la síntesis de andrógenos) después del tratamiento con metformina en NCI-H295R, incluido MC2R (receptor de ACTH) [53]. Por lo que es evidente la

modulación que puede tener este hipoglucemiante sobre las células adrenales. Queda por determinar si, en nuestro modelo celular, metformina puede modular los precursores de DHEA y si puede modular las enzimas CYP17A1 y HSD3B2 (**Figura 6**). Por otra parte, se ha reportado que, la concentración fisiológica mínima detectada, de este andrógeno, llega a ser de 0.23 ng/mL [55]. Metformina 4 mM indujo la síntesis de hasta 0.740 ng/mL de DHEA, y aunque no son las concentraciones reportadas que tienen un efecto inmunomodulador, valdrá la pena analizar su efecto sobre macrófagos infectados con Mtb. Centrando ahora la atención en la inmunidad innata, uno de los principales mecanismos de macrófagos y NTII, para la eliminación de Mtb, es la producción de LL-37 y hBD-2,3 y 4 [28]. Dado que metformina puede incrementar la producción de las hBD en estas células [16] y que las hormonas llegan a regular la síntesis de los AMPs, nos preguntamos si los AMPs podrían modular, a su vez, la síntesis de esteroides. Encontramos que, tanto las dos concentraciones de hBD-3 y LL-37 disminuyen la producción de cortisol con respecto a la condición sin estímulo, y lo mismo se observó con la producción de DHEA. En línea con este hallazgo, recientemente Díaz A, *et al.*, reportaron que hBD-2 y LL-37 disminuyen la síntesis tanto de cortisol como de DHEA, así como enzimas involucradas en su síntesis, en NCI-H292R [56]. Sin embargo, discernimos con sus resultados respecto a DHEA, ya que LL-37, en nuestro modelo, no modificó los niveles del andrógeno. En cuanto a la clínica, Bongiovani B, *et al.*, informaron que existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de cortisol y hBD-3 en pacientes con PTB [4], pero esto no significa que se incrementen mutuamente. De hecho, se ha reportado que el cortisol puede disminuir la producción de hBD-3 y LL-37 en células inmunes innatas infectadas con Mtb [7]. En nuestro modelo *in vitro*, el efecto observado de hBD-3 y de LL-37 sobre el cortisol, puede sugerir un mecanismo de retroalimentación negativa, para mitigar su producción cuando sus niveles llegan a ser elevados durante TB, aunque esto tendría que demostrarse en el contexto de infección con Mtb. Además, encontramos una tendencia de LL-37 para incrementar DHEA, curiosamente, este andrógeno favorece la expresión génica y proteica de LL-37 en macrófagos humanos infectados con Mtb [7], por lo que podrían llegar a

incrementarse mutuamente; aunque será necesario aumentar nuestra n para verificar si existen diferencias significativas. En línea con esto, también se reportó que existe una correlación positiva entre DHEA y LL-37 [4]. Además, observamos que LL-37 incremento la expresión génica de CYP11A1, que, como ya se mencionó, es una enzima crucial en el inicio de la síntesis de esteroides adrenales. También, aunque metformina no tiene efectos discernibles, hasta la fecha, sobre el péptido LL-37, sería importante evaluar si este AHO y la catelicidina pueden actuar en sinergia para aumentar la síntesis de DHEA en nuestro modelo y como afectarían la producción de cortisol. Este y otros trabajos, así como los estudios clínicos, comienzan a dar indicios del potencial vínculo entre las hormonas adrenales y los AMPs como efectores de la inmunidad innata (lo que refuerza aún más la ya conocida relación entre el sistema inmunológico y el sistema endocrino) (**figura 6**). Y, como haciendo uso de la terapia farmacológica para DMT2, se podría llegar a potenciar la actividad de células inmunes innatas, modulando la síntesis de glucocorticoides y los andrógenos.

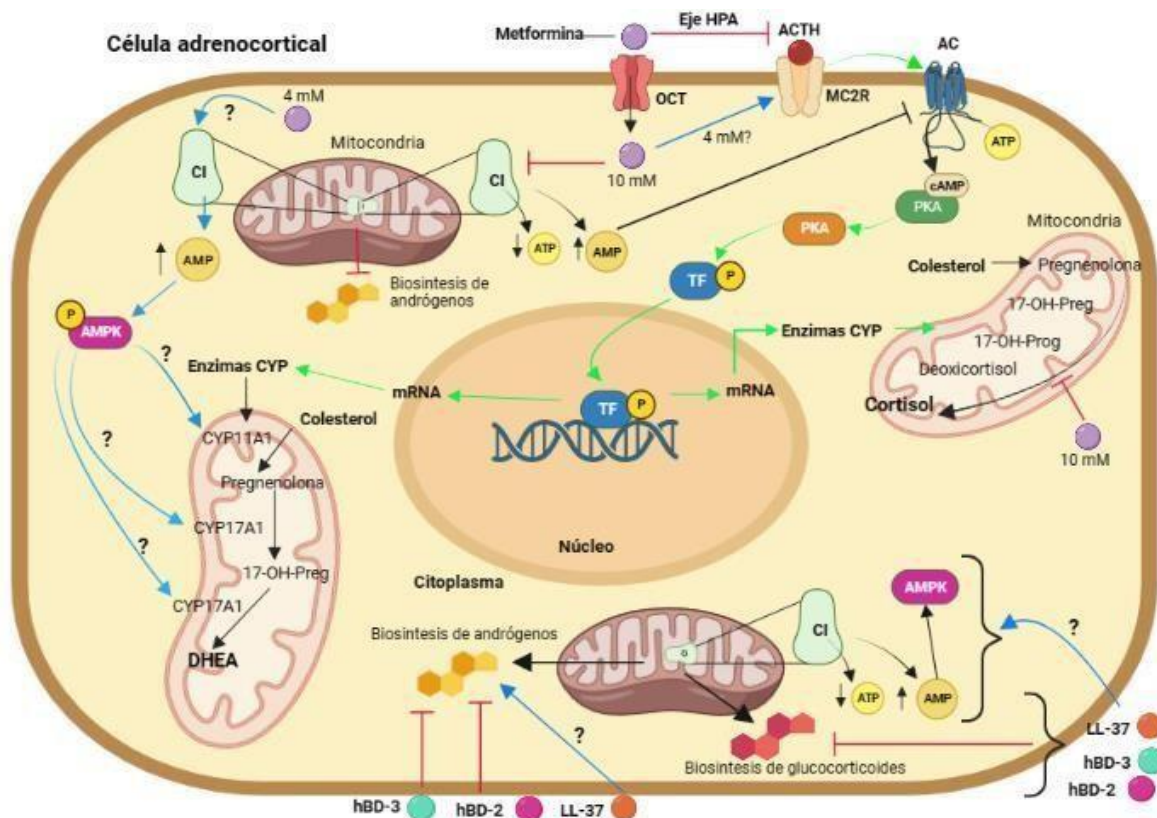


Figura 6. Mecanismo de acción propuesto de metformina y los AMPs para modular la síntesis de corticoesteroides. Las **flechas verdes** indican la vía canónica descrita para la síntesis de corticoesteroides. Las **líneas rojas** indican los efectos inhibitorios, descritos hasta ahora, tanto de metformina como de los AMPs sobre la biosíntesis de corticoesteroides. Las **flechas azules** indican, ya sea el mecanismo o el efecto potencial propuesto, por el cual metformina o los AMPs podrían modular los corticoesteroides. **HPA**; hipotálamo-pituitaria-adrenal, **OCT**; Transportador de cationes orgánicos, **ACTH**; Corticotropina, **AC**; Adenilato ciclasa, **MC2R**; Receptor de ACTH, **CI**; Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, **ATP**, Adenosín trifosfato, **AMP**; Adenosín monofosfato, **AMPK**, Proteína Kinasa activada por AMP, **cAMP**; Adenosín monofosfato cíclico, **PKA**; Proteína Kinasa activada por AC, **TF**; factor de transcripción, **P**; Fosforilación, **mRNA**; gen mensajero.

X. Conclusión

Los agentes hipoglucemiantes orales no afectan la síntesis de cortisol, y solo metformina incrementa la producción de DHEA. La hBD-3 disminuye la síntesis de cortisol y DHEA, y LL-37 solo atenúa la síntesis de cortisol. Por lo tanto, estos resultados sugieren que, hipoglucemiantes como la metformina y moléculas efectoras como los péptidos antimicrobianos, pueden modular hormonas corticoesteroides.

XI. Bibliografía

1. Bagcchi, S., *WHO's Global Tuberculosis Report 2022*. Lancet Microbe, 2023. **4**(1): p. e20.
2. Moule, M.G. and J.D. Cirillo, *Mycobacterium tuberculosis Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 65.
3. D'Attilio, L., et al., *Tuberculosis, the Disrupted Immune-Endocrine Response and the Potential Thymic Repercussion As a Contributing Factor to Disease Physiopathology*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 214.
4. Bongiovanni, B., et al., *Evidence that changes in antimicrobial peptides during tuberculosis are related to disease severity, clinical presentation, specific therapy and levels of immune- endocrine mediators*. Cytokine, 2020. **126**: p. 154913.
5. Diaz, A., et al., *The clinical recovery of tuberculosis patients undergoing specific treatment is associated with changes in the immune and neuroendocrine responses*. Pathog Dis, 2017. **75**(7).
6. Dlugovitzky, D., et al., *Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1997. **18**(3): p. 203-7.
7. Marin-Luevano, S.P., et al., *Steroid hormone modulates the production of cathelicidin and human beta-defensins in lung epithelial cells and macrophages promoting Mycobacterium tuberculosis killing*. Tuberculosis (Edinb), 2021. **128**: p. 102080.
8. Angerami, M., et al., *Modulation of the phenotype and function of Mycobacterium tuberculosis-stimulated dendritic cells by adrenal steroids*. Int Immunol, 2013. **25**(7): p. 405-11.
9. Falzon, D., et al., *Global reporting on tuberculosis preventive treatment among contacts*. Eur Respir J, 2022. **59**(3).
10. Sun, H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level*

- diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. Diabetes Res Clin Pract*, 2022. **183**: p. 109119.
11. Critchley, J.A., et al., *Glycemic Control and Risk of Infections Among People With Type 1 or Type 2 Diabetes in a Large Primary Care Cohort Study*. *Diabetes Care*, 2018. **41**(10): p. 2127-2135.
 12. Lagman, M., et al., *Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0118436.
 13. Ayala, T.S., et al., *High Glucose Environments Interfere with Bone Marrow-Derived Macrophage Inflammatory Mediator Release, the TLR4 Pathway and Glucose Metabolism*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 11447.
 14. Alim, M.A., et al., *Increased susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in a diet- induced murine model of type 2 diabetes*. *Microbes Infect*, 2020. **22**(8): p. 303-311.
 15. Pfeiffer, A.F. and H.H. Klein, *The treatment of type 2 diabetes*. *Dtsch Arztebl Int*, 2014. **111**(5): p. 69-81; quiz 82.
 16. Rodriguez-Carlos, A., et al., *Metformin promotes Mycobacterium tuberculosis killing and increases the production of human beta-defensins in lung epithelial cells and macrophages*. *Microbes Infect*, 2020. **22**(3): p. 111-118.
 17. Fatima, S., A. Bhaskar, and V.P. Dwivedi, *Repurposing Immunomodulatory Drugs to Combat Tuberculosis*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 645485.
 18. Yew, W.W., et al., *Metformin as a host-directed therapeutic in tuberculosis: Is there a promise?* *Tuberculosis (Edinb)*, 2019. **115**: p. 76-80.
 19. Parmar, J., R.E. Key, and W.E. Rainey, *Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(11): p. 4542-6.
 20. Mullen, N., et al., *Sublethal Hyperthermia Transiently Disrupts Cortisol Steroidogenesis in Adrenocortical Cells*. *Endocrinology*, 2023. **164**(5).

21. Dahlen, A.D., et al., *Trends in Antidiabetic Drug Discovery: FDA Approved Drugs, New Drugs in Clinical Trials and Global Sales*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 807548.
22. Piwkowska, A., et al., *Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(2): p. 268-73.
23. Singhal, A., et al., *Metformin as adjunct antituberculosis therapy*. Sci Transl Med, 2014. **6**(263): p. 263ra159.
24. Ohgami, N., et al., *Glibenclamide acts as an inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(2): p. 417-22.
25. Lamkanfi, M., et al., *Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome*. J Cell Biol, 2009. **187**(1): p. 61-70.
26. Estrada, D.E., et al., *Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals*. Metabolism, 1994. **43**(5): p. 591-8.
27. Ieronymaki, E., et al., *Insulin Resistance in Macrophages Alters Their Metabolism and Promotes an M2-Like Phenotype*. J Immunol, 2019. **202**(6): p. 1786-1797.
28. Torres-Juarez, F., et al., *LL-37 immunomodulatory activity during Mycobacterium tuberculosis infection in macrophages*. Infect Immun, 2015. **83**(12): p. 4495-503.
29. Song, W., et al., *In vitro bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **33**(3): p. 237-43.
30. Ruslami, R., et al., *Implications of the global increase of diabetes for tuberculosis control and patient care*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(11): p.

1289-99.

31. Dunachie, S. and P. Chamnan, *The double burden of diabetes and global infection in low and middle-income countries*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2019. **113**(2): p. 56-64.
32. Tegegne, B.S., et al., *Association between diabetes mellitus and multi-drug-resistant tuberculosis: evidence from a systematic review and meta-analysis*. Syst Rev, 2018. **7**(1): p. 161.
33. Harries, A.D., et al., *Diabetes mellitus and tuberculosis: programmatic management issues*. Int J Tuberc Lung Dis, 2015. **19**(8): p. 879-86.
34. Conradie, F., et al., *Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis*. N Engl J Med, 2020. **382**(10): p. 893-902.
35. Bongiovanni, B., et al., *Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2015. **95**(5): p. 562-9.
36. Hernandez-Pando, R., et al., *The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice*. Immunology, 1998. **95**(2): p. 234-41.
37. Ilhan, R., et al., *Novel regulation mechanism of adrenal cortisol and DHEA biosynthesis via the endogen ERAD inhibitor small VCP-interacting protein*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 869.
38. Azevedo, M.F., et al., *Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs)*. Endocr Rev, 2014. **35**(2): p. 195-233.
39. Al-Dujaili, E.A., et al., *Liquorice and glycyrrhetic acid increase DHEA and deoxycorticosterone levels in vivo and in vitro by inhibiting adrenal SULT2A1 activity*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **336**(1-2): p. 102-9.
40. Safiah, M., et al., *Effect of Metformin on Anthropometric Measurements and Hormonal and Biochemical Profile in Patients with Prediabetes*. J Diabetes Res, 2021. **2021**: p. 8275303.

41. Baptista, T., et al., *Insulin counter-regulatory factors, fibrinogen and C-reactive protein during olanzapine administration: effects of the antidiabetic metformin*. Int Clin Psychopharmacol, 2007. **22**(2): p. 69-76.
42. Cho, K., et al., *Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXRalpha/POMC pathway*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8145.
43. Kuo, T., et al., *Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids*. Adv Exp Med Biol, 2015. **872**: p. 99-126.
44. Szoke, E., et al., *Effects of glimepiride and glyburide on glucose counterregulation and recovery from hypoglycemia*. Metabolism, 2006. **55**(1): p. 78-83.
45. Gangji, A.S., et al., *A systematic review and meta-analysis of hypoglycemia and cardiovascular events: a comparison of glyburide with other secretagogues and with insulin*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 389-94.
46. Hardin, M.D. and T.F. Jacobs, *Glyburide*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Tibb Jacobs declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
47. By the American Geriatrics Society Beers Criteria Update Expert, P., *American Geriatrics Society 2019 Updated AGS Beers Criteria(R) for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults*. J Am Geriatr Soc, 2019. **67**(4): p. 674-694.
48. Geer, E.B., J. Islam, and C. Buettner, *Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014. **43**(1): p. 75-102.
49. Brossaud, J., et al., *Altered Cortisol Metabolism Increases Nocturnal Cortisol Bioavailability in Prepubertal Children With Type 1 Diabetes Mellitus*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 742669.
50. Hirsch, A., et al., *Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4354-66.

51. Foretz, M., B. Guigas, and B. Viollet, *Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential*. Nat Rev Endocrinol, 2023: p. 1-17.
52. Hirsch, A., et al., *Role of AMP-activated protein kinase on steroid hormone biosynthesis in adrenal NCI-H295R cells*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30956.
53. Udhane, S.S., et al., *Combined transcriptome and metabolome analyses of metformin effects reveal novel links between metabolic networks in steroidogenic systems*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8652.
54. Nanba, K., A.R. Blinder, and W.E. Rainey, *Primary Cultures and Cell Lines for In Vitro Modeling of the Human Adrenal Cortex*. Tohoku J Exp Med, 2021. **253**(4): p. 217-232.
55. Campi, B., et al., *Quantification of dehydroepiandrosterone in human serum on a routine basis: development and validation of a tandem mass spectrometry method based on a surrogate analyte*. Anal Bioanal Chem, 2018. **410**(2): p. 407-416.
56. Diaz, A., et al., *The relationship between host defense peptides and adrenal steroids. An account of reciprocal influences*. Cytokine, 2023. **168**: p. 156229.
57. Chunyan Li, Fen Wang, Anli Tong et al. Metformin Inhibit Cell Proliferation and Secretion Function in NCI-H295R Cells, 18 May 2020, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-26937/>]

XII. Anexos

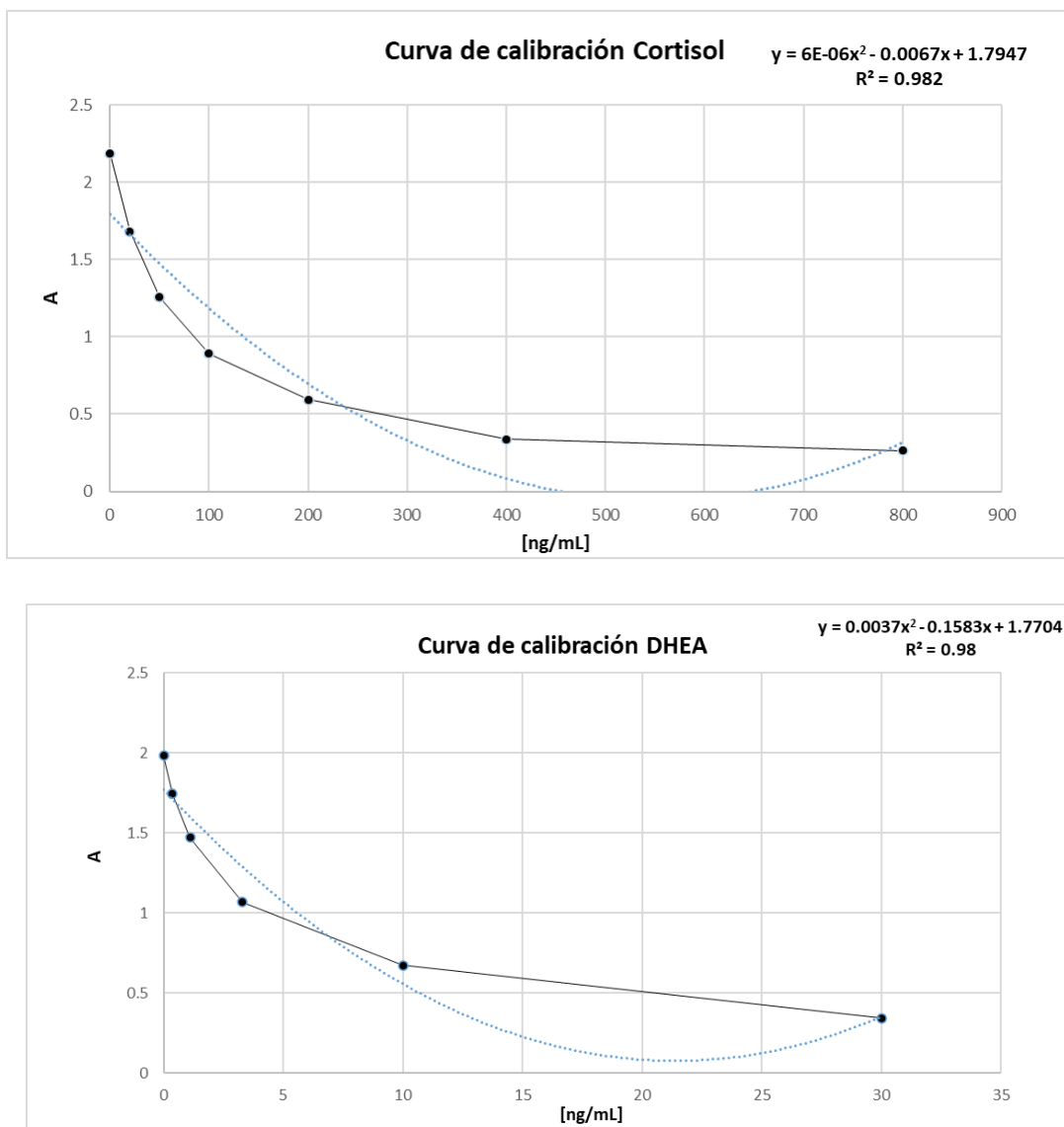


Figura suplementaria 1. Curvas de calibración usadas para el cálculo de la concentración de cortisol y DHEA en los sobrenadantes de células adrenales. Se muestran curvas de calibración representativas para **cortisol** (gráfica superior) y **DHEA** (gráfica inferior).