

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE
MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Papel del miR-200a en el control de la infección
por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en
macrófagos murinos J774”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

BRISA MARCELA SÁNCHEZ CAMACHO

DIRECTOR

DR. MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, Julio, 2020.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Grado, Nombre completo e Institución

Secretario: Grado, Nombre completo e Institución

Vocal: Grado, Nombre completo e Institución

1er. Suplente: Grado, Nombre completo e Institución

2do. Suplente: Grado, Nombre completo e Institución

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Posgrado en Ciencias Genómicas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y, en especial, al Posgrado en Ciencias Genómicas por darme la oportunidad para realizar mis estudios de posgrado.

Este proyecto fue financiado por la UACM, convocatoria Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología (CCyT)-2019, UACM, **PI-CCyT-2019-06**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca **705617**.

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo económico para asistir y presentar este proyecto en el VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología que se llevó a cabo del 27 al 31 de octubre de 2019 en Oaxaca, Oaxaca, México.

Al Dr. Mauricio Castañón Arreola por su tutoría, paciencia, enseñanzas y tiempo compartido.

A la M. en C. Claudia Carranza Salazar por todo el apoyo que me brindo.

Al Dr. Mario César López Camarillo y Dra. Lilia López Cánovas por su tiempo y recomendaciones.

A la Dra. Olga Noemí Hernández de la Cruz y al M. en C. Cristhian Sánchez Cruz por su apoyo, consejos y amistad.

A todos los integrantes del Posgrado en Ciencias Genómicas: Profesores-Investigadores, estudiantes y personal administrativo

DEDICATORIAS

A mi mamá, Marisela
Por educarme con buenos sentimientos, hábitos y valores
Por impulsarme a luchar por mis sueños
Por apoyarme incondicionalmente
Por todo el amor compartido durante estos años
¡Gracias, mamá!

A mi papá, Francisco
A mis hermanos, Ximena y Ángel
Por su cariño, apoyo y paciencia
¡Los quiero!

A toda mi familia.
Por apoyar mis locuras y sueños

A Rubén
Por tu amistad
Por siempre estar

A mi compañero de travesuras, Iker
Por darme el privilegio de verte crecer
Por cada uno de los momentos en los que, tu sonrisa,
me hizo recordar lo bella que es la vida
¡Gracias mi príncipe encantador!

“Si permaneces esperando el momento ideal,
nunca saldrás de donde estás;
es preciso un poco de locura
para dar el siguiente paso”
Paulo Coelho

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Tuberculosis.....	14
1.1.1 Epidemiología.....	14
1.1.2 La Tuberculosis.....	14
1.1.3 Diagnóstico y tratamiento.....	17
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
1.2.1 Pared celular.....	18
1.2.2 Virulencia.....	19
1.2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	19
1.3 Respuesta inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.3.1 Macrófagos.....	21
1.3.2 Receptores de reconocimiento de patógenos.....	21
1.3.3 Propiedades antimicrobianas de macrófagos.....	22
1.4 Regulación de la Respuesta Inmune por microRNAs.....	25
1.4.1 Biogénesis de microRNAs.....	26
1.4.2 miRNAs en infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
2. ANTECEDENTES.....	31
2.1 Antecedentes particulares.....	36
2.1.1 microRNA-200a.....	36
2.1.2 Regulación de la familia miR-200.....	42
3. HIPÓTESIS.....	44
4. JUSTIFICACIÓN.....	45
5. OBJETIVOS.....	46
5.1 Objetivo general.....	46

5.2	Objetivos particulares.....	46
6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	47
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
7.1	Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	48
7.2	Línea celular de macrófagos murinos J774.....	48
7.3	infección de macrófagos con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	49
7.4	Transfección con el mimetizador e inhibidor del miR-200a.....	49
7.5	Extracción de RNA.....	50
7.6	Análisis de expresión del miR-200a.....	51
7.7	Determinación de Unidades Formadoras de Colonias.....	52
7.8	Síntesis de cDNA.....	53
7.9	Análisis de la expresión de <i>tnf-a</i> , <i>nfkbia</i> , <i>tlr4</i>	53
7.10	Análisis <i>in silico</i>	55
7.11	Análisis estadístico.....	55
8.	RESULTADOS.....	56
8.1	Perfil de expresión del miR-200a en macrófagos murinos J774 infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	56
8.2	Ensayo de mimetismo e inhibición del miR-200a.....	58
8.3	Efecto del mimetismo y la inhibición del miR-200a en el crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	60
8.4	Análisis <i>in silico</i>	62
8.5	Análisis de la expresión de <i>tnf-a</i>	65
8.6	Análisis de la expresión de genes blanco del miR-200a.....	68
9.	DISCUSIÓN.....	71
10.	CONCLUSIONES.....	77
11.	PERSPECTIVAS.....	78
12.	REFERENCIAS.....	79
13.	ANEXOS.....	94

INDICE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Parámetros de amplificación para RT-qPCR.....	52
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR.....	54
Tabla 3. Genes blancos predichos del miR-200a	63
Tabla Suplementaria 1. Oligonucleótidos diseñados para los genes blanco putativos seleccionados mediante el análisis <i>in silico</i>	94
Tabla suplementaria 2. Genes blancos putativos del miR-200a	95

INDICE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y formación del granuloma.....	16
Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Figura 3. Mecanismos antimicrobianos de los fagocitos.....	24
Figura 4. Biogénesis de microRNAs.....	28
Figura 5. MicroRNAs en infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Figura 6. Familia miR-200	37
Figura 7. Genes blancos putativos de la familia miR-200 en la vía de señalización de TLR4	41
Figura 8. Regulación de la expresión de la familia miR-200	43
Figura 9. Esquema del ciclo de PCR	54
Figura 10. Expresión del miR-200a en macrófagos J774 infectados con <i>M. tuberculosis</i>	57
Figura 11 Mimetismo e inhibición de la expresión del miR-200a.....	59
Figura 12 Crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61
Figura 13. Alineamiento del miR-200a con sus genes blanco.....	64
Figura 14. Expresión de <i>tnf-a</i> en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> MOI 1.....	66
Figura 15. Expresión de <i>tnf-α</i> en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> MOI 3	67
Figura 16. Expresión de <i>tlr4</i> y <i>nfkb1a</i> en macrófagos J774.....	69
Figura 17. Expresión de <i>tlr4</i> y <i>nfkb1a</i> en macrófagos J774	70
Figura Suplementaria 1. Crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> en MDM	99

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
DC	Células Dendríticas
EMT	Transición Epitelio-Mesenquimal
ESAT-6	Objetivo antigénico secretor temprano de 6 kDa
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IFN- γ	Interferón gamma
IRAK1	Cinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1
JAK	Cinasas Janus
LAM	Lipoarabinomanano
LPS	Lipopolisacárido
LTBI	Tuberculosis latente
MDM	Macrófagos derivados de monocitos humanos
miRNA	microRNAs
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
MyD88	Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NFKBIA	Inhibidor alfa del Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido nítrico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SFB	Suero Fetal Bovino
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción

TB	Tuberculosis
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTR	Región no traducida
VHC	Virus de Hepatitis C
VHB	Virus de Hepatitis B
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ZEB1/2	Homeobox 1/2 de unión a E-box de dedo de zinc

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las patologías infectocontagiosas más letales en el mundo y se estima que afecta a una cuarta parte de la población mundial. La TB es provocada por *Mycobacterium tuberculosis* y afecta principalmente el tracto respiratorio. En los pulmones, los macrófagos alveolares, juegan un papel muy importante en la respuesta inmune del hospedero contra la infección por *M. tuberculosis*; dicha respuesta está regulada por diversos mecanismos, entre ellos, los microRNAs (miRNAs). En este trabajo se evaluó la expresión del miR-200a en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1:1 ó 1:3), encontrando que tras la infección se indujo la expresión del miR-200a a las 24 y 48 horas, siendo mayor a las 48 horas (MOI 1:3). Por otro lado, determinamos que la transfección con el mimetizador del miR-200a (25 nM ó 50 nM), favoreció el crecimiento intracelular del patógeno, no obstante, la inhibición del miR-200a no modificó el número de las UFC. Asimismo, observamos que al sobreexpresar el miR-200a, la expresión del *tnf-a* se incrementó; mientras que al inhibir el miRNA (con 25 nM del inhibidor) su expresión disminuyó. Aunado a esto, mediante análisis *in silico*, determinamos que el miR-200a tiene como posibles genes blanco a *tlr4*, *nfkbia*, *nfkbie*, *nfk2*, *tab1*, *myd88*, *dlc-1*, *pik3ca*, *pik3r1*, *tgfbr1*, *irak2*, *stat5a* y *bcl2a1d*. La sobreexpresión del miR-200a (con 50 nM del mimetizador), incrementó la expresión de *tlr4* y *nfkbia*, mientras que la inhibición del miRNA con 25 nM y 50 nM del inhibidor disminuye la expresión de *nfkbia* y *tlr4*, respectivamente, durante la infección por *M. tuberculosis*. Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que al sobreexpresarse el miR-200a durante la infección se favorece la supervivencia de *M. tuberculosis* H37Rv, sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo mediante el cual el miR-200a permite la sobrevivencia del bacilo.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the most lethal infectious diseases in the world and is estimated to affect a quarter of the world population. TB is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and mainly affects the respiratory tract. In the lungs, alveolar macrophages play a crucial role in the host's immune response against *M. tuberculosis* infection; this response is regulated by various mechanisms, including microRNAs (miRNAs). In this work, the expression of miR-200a in murine J774 macrophages infected with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1: 1, 1: 3) was evaluated. After infection, we find that the expression of miR-200a increases at 24 and 48 hours, being higher at 48 hours (MOI 1: 3). On the other hand, we determined that the transfection of the miR-200a mimic (25 nM and 50 nM), favors the intracellular growth of the pathogen, however, the inhibition of miR-200a showed no effect on the number of CFUs. Likewise, we observe that when overexpressing miR-200a, the expression of *tnf- α* increases and inhibition of miR-200a (25 nM) decreases *tnf- α* expression. In addition to this, through in silico analysis, we determined that the miR-200a has as potential target genes: *tlr4*, *nfkbia*, *nfkbie*, *nfk2*, *tab1*, *myd88*, *dlc-1*, *pik3ca*, *pik3r1*, *tgfbr1*, *irak2*, *stat5a*, *bcl2a1d*. We found that miR-200a overexpression increases expression of *tlr4* and *nfkbia*, while inhibition decreases the expression of these genes. Therefore, our results suggest that over-expressing miR-200a during infection favors *M. tuberculosis* H37Rv infection; however, more studies are required to elucidate the mechanism by which miR-200a allows bacillus survival.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TUBERCULOSIS

1.1.1 Epidemiología

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa y transmisible que más ha afectado a la humanidad, constituyendo una importante causa de morbilidad. La TB es la novena causa de muerte a nivel mundial y la principal enfermedad debida a un solo agente infeccioso, con una incidencia superior a la de la infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (OMS, 2019). Se estima que aproximadamente una cuarta parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y por tanto, expuesta a la enfermedad. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2018, fallecieron 1.5 millones de personas de las cuales, 251 000 padecían VIH. Además, en ese mismo año, enfermaron de TB 10 millones de personas, de los cuales, la mayoría se registraron en Asia Sudoriental (44%), África (24%) y el Pacífico Occidental (18%) y, con porcentajes menores, el Mediterráneo oriental (8%), Europa (3%) y las Américas (3%) (OMS, 2019).

En América Latina, en el año 2017, México ocupó el tercer lugar en casos nuevos de tuberculosis, registrándose 28,000. La incidencia nacional de TB, para la semana 52 del año 2018, fue de 14 casos por cada 100,000 habitantes; siendo los estados de Baja California, Sonora, Tamaulipas, Guerrero y Sinaloa, los de mayor incidencia de la enfermedad (SSA, 2019; OPS, 2018).

1.1.2 La Tuberculosis

La TB es una patología infectocontagiosa crónica provocada por bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Este engloba micobacterias que presentan >95% de homología en su DNA; está compuesto además de *M. tuberculosis* (causante de TB en los humanos), por *M. bovis* (genera TB en bovinos), *M. africanum* (principal

causante de TB en África tropical), *M. microtti* (causante de TB en roedores y otros mamíferos), *M. cannetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* (Dorronsoro I & Torroba L., 2007).

La TB se manifiesta en dos formas principales: infección latente (LTBI), en la cual, los individuos infectados con el bacilo permanecen en un estado asintomático y; tuberculosis activa, en la que los pacientes presentan los síntomas de la enfermedad: fiebre, fatiga, pérdida de apetito y pérdida de peso, tos con sangre, dolor en el pecho (al respirar y/o toser), resfriado, sudores nocturnos, etc. Solo el 5% de los individuos con LTBI pueden desarrollar TB activa en los primeros 5 años de la infección, en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune; mientras que el 95% restante, mantendrá una infección latente el resto de su vida. En la mayoría de los casos, la TB es una enfermedad curable, pero el acceso restringido a los cuidados de salud es el mayor impedimento para la mayoría de las personas que padecen la enfermedad, sobre todo en ciudades en desarrollo (Dheda K, *et al.*, 2010; Pai et al., 2016).

La transmisión del patógeno ocurre por la inhalación de fluidos respiratorios contaminados con *M. tuberculosis*, liberados por un individuo infectado. Una vez en el aparato respiratorio, la bacteria es fagocitada por macrófagos alveolares y células dendríticas, dentro de ellas, *M. tuberculosis* bloquea la fusión del fagosoma con el lisosoma, asegurando su sobrevivencia. Las células inicialmente infectadas, liberan citocinas proinflamatorias que ayudan a reclutar más células dendríticas, monocitos y neutrófilos al sitio de la infección, para la formación del granuloma o tubérculo (Russell DG, 2001; Ernest JD, 2012; Pai *et al.*, 2016).

Los granulomas son las lesiones clásicas histopatológicas de tuberculosis. Estos son agregados organizados de macrófagos que exhiben múltiples fenotipos: macrófagos maduros, macrófagos epitelioides o diferenciados, macrófagos espumosos y células gigantes multinucleadas (MGCs) o Langhans, formadas por la fusión de membrana, de varios macrófagos. En el hospedero este tejido contiene la infección, no hay signos evidentes de enfermedad ni transmisión del patógeno. La contención falla después de un cambio en el sistema inmune del hospedero, debido a la vejez, desnutrición o por una coinfección, con VIH, por ejemplo; permitiendo el escape de la

bacteria (Saunders, Orme, & Basaraba, 2017; Mortaz *et al.*, 2012; Flynn, 2001; Russell, 2007).

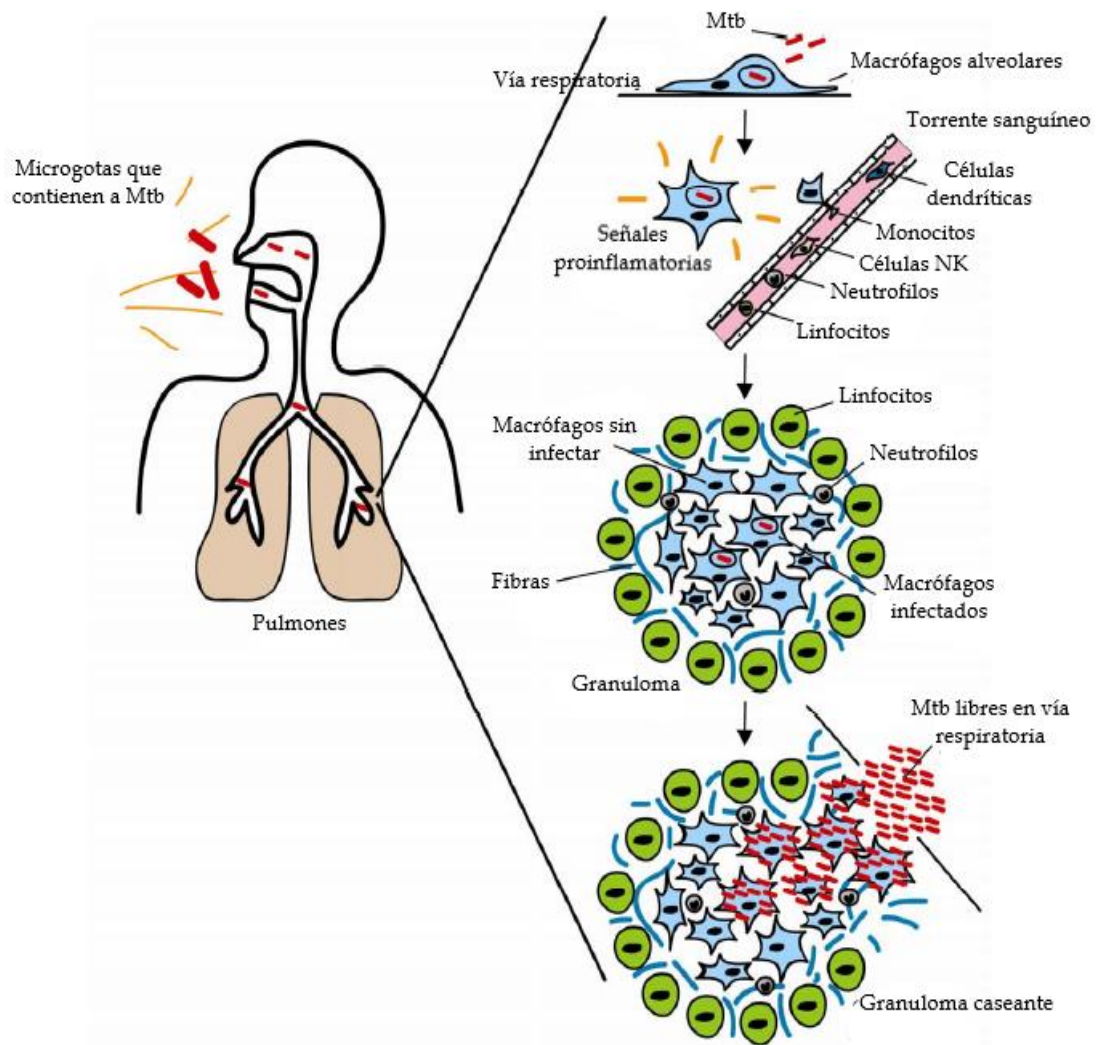


Fig. 1. Infección con *Mycobacterium tuberculosis* y formación del granuloma. Los macrófagos alveolares residentes fagocitan a las bacterias inhaladas, esto inicia a una respuesta proinflamatoria y al reclutamiento de otras células del sistema inmune innato y adaptativo y, a la formación del granuloma. Los bacilos pueden estar contenidos dentro del granuloma durante largos periodos de tiempo, pero, si el control inmune falla, los bacilos comenzarán a replicarse y se desarrollará un granuloma necrótico. El granuloma se rompe y derrama *M. tuberculosis* en las vías respiratorias (Tomado y modificado de Wellin, 2011).

1.1.3 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico microbiológico de la TB exige la detección, aislamiento e identificación de *M. tuberculosis*, así como la determinación de su sensibilidad a los antibióticos. En general, el examen microscópico directo de muestras clínicas mediante baciloscopía (técnicas de tinción específicas), es la menos sensible pero la más rápida; mientras que los cultivos bacterianos son más sensibles y más lentos y; por otro lado, la detección por métodos moleculares de secuencias específicas del DNA del bacilo, tienen una sensibilidad menor que los cultivos, pero son más rápidas. Se han desarrollado gran variedad de pruebas inmunológicas, que ponen de manifiesto la respuesta específica del hospedero frente al agente infeccioso. La prueba de la tuberculina fue la primera en ser empleada y, hasta entonces, ha sido la más utilizada; sin embargo, no permite diferenciar la infección de la enfermedad. Así mismo, los sistemas de diagnóstico basados en la liberación de IFN- γ han surgido como una alternativa para la detección de la TB.

Los casos establecidos de TB son tratados con una combinación de cuatro antibióticos de primera línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol; que se administra durante seis meses y que debe de ser acompañada de tareas de información pertinentes y atención al paciente (Dorronsoro I & Torroba L., 2007; OMS, 2019; Pai *et al.*, 2016).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Fue descubierto y descrito por Robert Koch en 1882. Perteneció al género *Mycobacterium*, el cual agrupa a más de 120 especies, la mayoría de ellas ambientales y no patógenas, conocidas como micobacterias no tuberculosas. *M. tuberculosis* es un bacilo Gram positivo, aerobio, con preferencia por tejidos bien oxigenados. Es un patógeno intracelular obligado, ácido-alcohol resistente, con tamaño entre 0.2-0.7 μm , ligeramente curvados, inmóviles, no forman esporas ni cápsulas y son de crecimiento lento (12-24 h, en condiciones óptimas). Además, son sensibles al calor, la luz solar y

luz ultravioleta, pero son resistentes al frío, a la congelación y a la desecación (González-Martín J, 2014; Russell DG, 2001).

1.2.1 Pared Celular

La pared celular de *M. tuberculosis* es rica en ácidos micólicos, este es un componente específico de la pared celular micobacteriana y constituye el 50% de su peso seco. Debido a esta gruesa capa, aumenta la resistencia de la bacteria a la degradación por enzimas lisosomales. Los ácidos micólicos se encuentran unidos a arabinogalactanos, que a su vez están unidos a peptidoglicanos. Además, su pared celular contiene lipoglicanos incluyendo a lipoarabinomananos (LAM), lipomananos (LM) y fosfatidil-*myo*-inositol manosidos (PIM). Todos estos componentes están anclados a la membrana plasmática y se extienden hacia el exterior de la pared celular (Wellin, 2011; Kleinnijenhuis *et al.*, 2011).

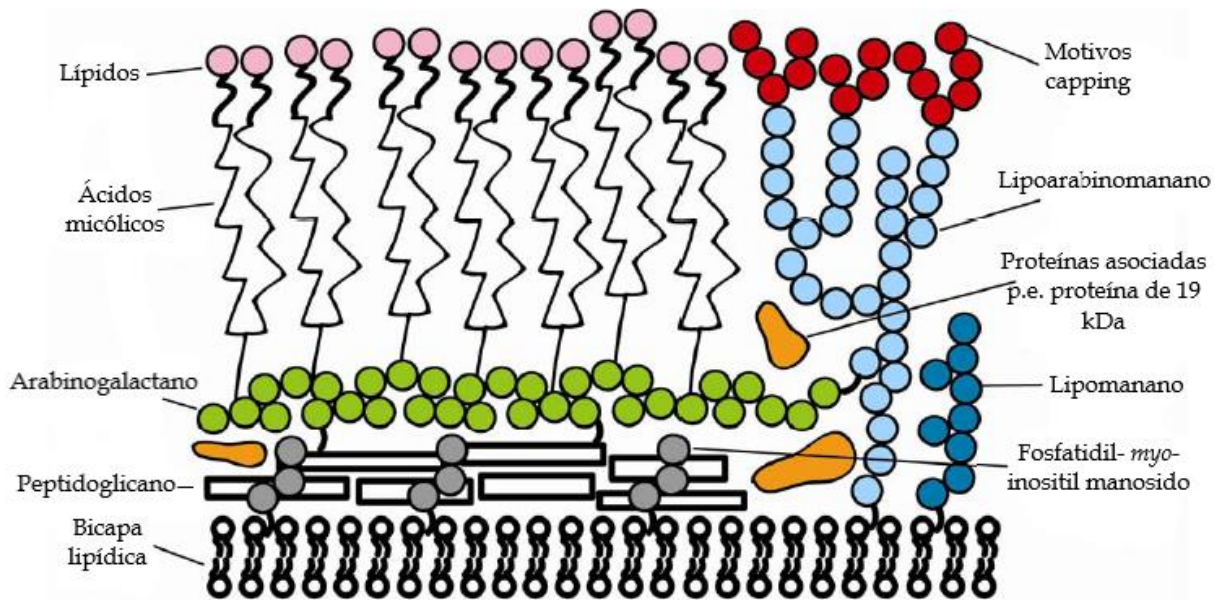


Fig. 2 Representación esquemática de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Los arabinogalactanos están unidos a los péptidos glicanos; los ácidos micólicos y glicolípidos que se extienden hacia el exterior de la pared celular (Tomado y modificado de Wellin, 2011).

1.2.2 Virulencia

La capacidad de un patógeno bacteriano para sobrevivir dentro de un organismo hospedero requiere de la expresión de una serie de determinantes genéticos involucrados en la interacción patógeno-hospedero, situación que le permite resistir el estrés fisiológico y ambiental. En el caso de *M. tuberculosis* el lipoarabinomano (LAM), actúa como un factor de virulencia, contribuyendo a la inhibición de las funciones del macrófago necesarias para eliminar al patógeno. Este factor de virulencia actúa mediante la inhibición fagosomal, eliminando los radicales libres de oxígeno potencialmente citotóxicos para la bacteria, inhibiendo la actividad de la proteína cinasa C, bloqueando la transcripción de genes inducibles de IFN- γ e inhibiendo la activación de macrófagos; lo que conlleva a la persistencia de la micobacteria dentro de los macrófagos (Chan *et al.*, 1991). Además, la bacteria contiene, en su pared celular, una lipoproteína de 19 kDa, de la cual se desconoce su función, pero, que se ha visto implicada en la virulencia de *M. tuberculosis*, participando en la muerte celular del hospedero y modificando los mecanismos bactericidas de los macrófagos (Ciaramella A *et al.*, 2000). Por otro lado, ESAT-6 (6 kDa, *early secretory antigenic target*) es secretada como un complejo heterodimérico con CFP-10 (10 kDa, *Culture filtrate protein*) por el sistema de secreción ESX-1 (tipo VII); el cual se encuentra codificado en la región de diferencia, RD-1, del genoma de *M. tuberculosis*. ESX-1 media la exportación de factores de virulencia que desarman al macrófago permitiéndole modular la respuesta inmune innata del hospedero en las primeras etapas de la infección (McLaughlin *et al.*, 2007). ESAT-6, así como LAM y la lipoproteína de 19 kDa, provocan una respuesta específica en el hospedero infectado; por lo tanto, son los principales determinantes de virulencia de *M. tuberculosis*.

1.2.3 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

M. tuberculosis H37Rv es una cepa de referencia, también conocida como cepa tipo, que fue aislada de un paciente de 19 años con TB pulmonar en 1905; después divergió en la cepa virulenta (H37Rv) y la cepa avirulenta (H37Ra) (Steenken W, *et al.*,

1934). La cepa H37Rv es comúnmente usada para el estudio de la patogénesis de *M. tuberculosis* en diferentes sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv posee 4.4×10^6 pb y contiene aproximadamente 4,000 genes. Posee características únicas, tales como, un alto número de genes (más de 200) que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, lo que podría estar relacionado con su habilidad para crecer en los tejidos de su hospedero en donde, estas moléculas, son la principal fuente de carbono. *M. tuberculosis* cuenta con 167 genes que codifican para la familia de proteínas PE y PPE, que se localizan en la pared y membrana celular y a las que se les ha relacionado con la variación antigénica durante la infección. Asimismo, codifica para, al menos, trece factores sigma y más de cien proteínas reguladoras de represión/activación transcripcional, sistemas serina-treonina cinasas y otros genes reguladores (Maulén, 2011; Smith, 2003; Schluger, 2005).

1.3 RESPUESTA INMUNE CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

La respuesta inmune innata tiene un papel importante en la protección contra *M. tuberculosis*, porque provee la primera línea de defensa contra el patógeno y es capaz de eliminar la infección, en la mayoría de los casos. El sistema inmune innato está conformado por barreras anatómicas, como la piel; por el sistema del complemento y por diversos tipos celulares: Células Dendríticas (DCs), neutrófilos, células Natural Killer (NK) y macrófagos. El reconocimiento de *M. tuberculosis*, ocurre mediante receptores acoplados a las membranas plasmáticas y conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias para controlar la infección y eliminar a la bacteria (Philips J & Ernst J, 2012; Schorey J & Schlesinger L, 2016).

1.3.1 Macrófagos

Los macrófagos son células mononucleares grandes del sistema inmune innato que funcionan como fagocitos profesionales; es decir, son capaces de “comer” partículas más grandes a 0.5 μm , incluyendo microorganismos patógenos. En los procesos infecciosos, su papel es el de ingerir y destruir patógenos, reclutar otras células del Sistema Inmune y presentar antígenos del microorganismo a las células del sistema inmune adaptativo. Los precursores de los macrófagos son los monocitos que circulan en el torrente sanguíneo y que se reclutan a los sitios de infección o de tejido dañado cuando son estimulados; cuando se diferencian a macrófagos, incrementan su capacidad fagocítica, tienen diferente morfología y propiedades adhesivas. Funcionalmente, los macrófagos se polarizan en los subtipos M1 y M2, dependiendo de cómo sean estimulados y pueden adoptar un perfil pro- o antiinflamatorio. Los macrófagos M1, son activados clásicamente: la polarización es inducida por citocinas proinflamatorias o Th1 (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) y productos microbianos, y tienen propiedades bactericidas e inflamatorias. Los macrófagos activados alternativamente (M2) son inducidos por citocinas Th2 o antiinflamatorias (IL-4, IL-13, IL-10, M-CSF) y tienen propiedades regulatorias y no tienen capacidades bactericidas (Schorey J & Schlesinger L, 2016; Landsman L & Jung S, 2007; Murray P & Wynn T, 2011).

1.3.2 Receptores de reconocimiento de patógenos

La interacción entre *M. tuberculosis* y las células inmunes, ocurre mediante receptores acoplados a sus membranas plasmáticas, los cuales reconocen diferentes moléculas del patógeno. Entre estos receptores se incluyen a: receptores de lectina tipo-C (CLRs): receptor de manosa (MMR), DC-SIGN (DC-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) y Dectina-1; receptores Scavenger (SRs): SR-A1, MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), CD36, SR-B1; receptores del complemento (CRs): CR1, CR3, CR4 y receptores tipo Toll (TLR): TLR2, TLR4, TLR9 (Philips J & Ernst J, 2012; Schorey J & Schlesinger L, 2016; Ernst J, 1998).

1.3.3 Propiedades antimicrobianas de macrófagos

Los macrófagos median la primera línea de defensa del hospedero contra diversos patógenos intracelulares. Están armados con varios mecanismos efectores inmunes para detectar y combatir a los patógenos, entre estos mecanismos encontramos: fusión o maduración del fagosoma-lisosoma, autofagia, apoptosis, especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno (Bhat & Yaseen, 2018).

Maduración del fagosoma. La maduración típica del fagosoma involucra una fusión secuencial del fagosoma con endosomas tempranos, endosomas tardíos, y lisosomas. El lisosoma es un organelo vacuolar complejo de la ruta endocítica tardía; dentro de las vacuolas lisosomales hay potentes enzimas hidrolíticas capaces de degradar un amplio rango de macromoléculas, incluyendo microbios. Durante la maduración del fagosoma, el pH decrece a 4.5-5.0 mediante las acciones de una ATPasa vacuolar. También adquiere péptidos antimicrobianos y proteasas, que son activadas por el pH ácido del fagosoma. Todos estos factores contribuyen a la naturaleza bactericida del fagosoma y facilitan la eliminación de la partícula ingerida (Mellman *et al.*, 1986; Flynn, 2001; Weiss G & Schaible U, 2015).

Sin embargo; algunos patógenos, incluyendo a *M. tuberculosis*, tienen la capacidad de alterar al fagosoma para que sirva como nicho para su replicación intracelular. El medio interno de los fagosomas con *M. tuberculosis* es menos ácido (pH 6.2) y no se fusionan con lisosomas; los componentes de *M. tuberculosis* que intervienen en el arresto de la maduración del fagosoma son: ESAT-6/CFP-10, SecA1/2, ManLAM y TDM. Se ha propuesto que *M. tuberculosis* puede escapar del fagosoma y replicarse en el citosol celular; una explicación para esta observación es que el sistema de secreción ESX-1 perfora, pero no destruye, la membrana fagosomal permitiendo el escape del bacilo tuberculoso del fagosoma (Russell DG, 2001; Deretic V *et al.*, 2006).

Autofagia. Es un proceso por el cual los organelos de doble membrana, autofagosomas, capturan y degradan componentes citoplasmáticos: agregados

proteicos, organelos dañados y microbios intracelulares. La formación de las autofagosomas depende de dos sistemas proteico-lipídicos: *Atg5/Atg12* y *Atg8/LC3*; regulados por vías de señalización, que responden a la falta de nutrientes, estrés, mediadores inmunes, etc. La manipulación de la autofagia se ha propuesto como una opción para el tratamiento de TB. *In vivo* la autofagia es un proceso importante; ya que, en ratones deficientes de autofagia, hay un incremento en el crecimiento de *M. tuberculosis* (Bento *et al.*, 2015; Watson *et al.*, 2012).

Apoptosis. Es un mecanismo de defensa crucial contra los patógenos; puede ser activado por vía intrínseca (vía mitocondrial), que depende de señales intracelulares y de la liberación de proteínas del espacio intermembranal mitocondrial y, por la vía extrínseca, que se activa por medio de ligandos extracelulares e iniciada por los receptores de muerte (receptores de TNF- α y receptores Fas) en la superficie celular. Este mecanismo, no sólo restringe el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*, sino también, tiene un importante papel en la respuesta inmune adaptativa (Philips J & Ernst J, 2012; Liu *et al.*, 2017).

Intermediarios Reactivos de Nitrógeno. Los macrófagos bajo estimulación bacteriana producen óxido nítrico sintasa inducible, iNOS o NOS2, para producir Óxido Nítrico (NO) y citrulina a partir de L-arginina y O₂. El NO, al reaccionar con los radicales de oxígeno producidos por la NADPH oxidasa, es convertido en intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI); los cuales, son muy tóxicos para los microbios en el fagosoma porque generan daño en el DNA, lípidos y proteínas (Flynn, 2001; Flannagan RS, 2009).

Especies Reactivas de Oxígeno. Los macrófagos usan la NADPH oxidasa NOX1 para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) para eliminar microorganismos. Tras la activación el complejo enzimático de la NADPH oxidasa se ensambla en la membrana del fagosoma de manera dependiente de Rac-1 o Rac-2. La NADPH oxidasa activada transfiere electrones citosólicos dentro del fagosoma, quienes reaccionan con el O₂, generando superóxido (O₂⁻) quien a su vez genera peróxido y este, al reaccionar

con O_2 produce diferentes radicales, que eliminan a los microorganismos intrafagosomales (Robinson J, 2009).

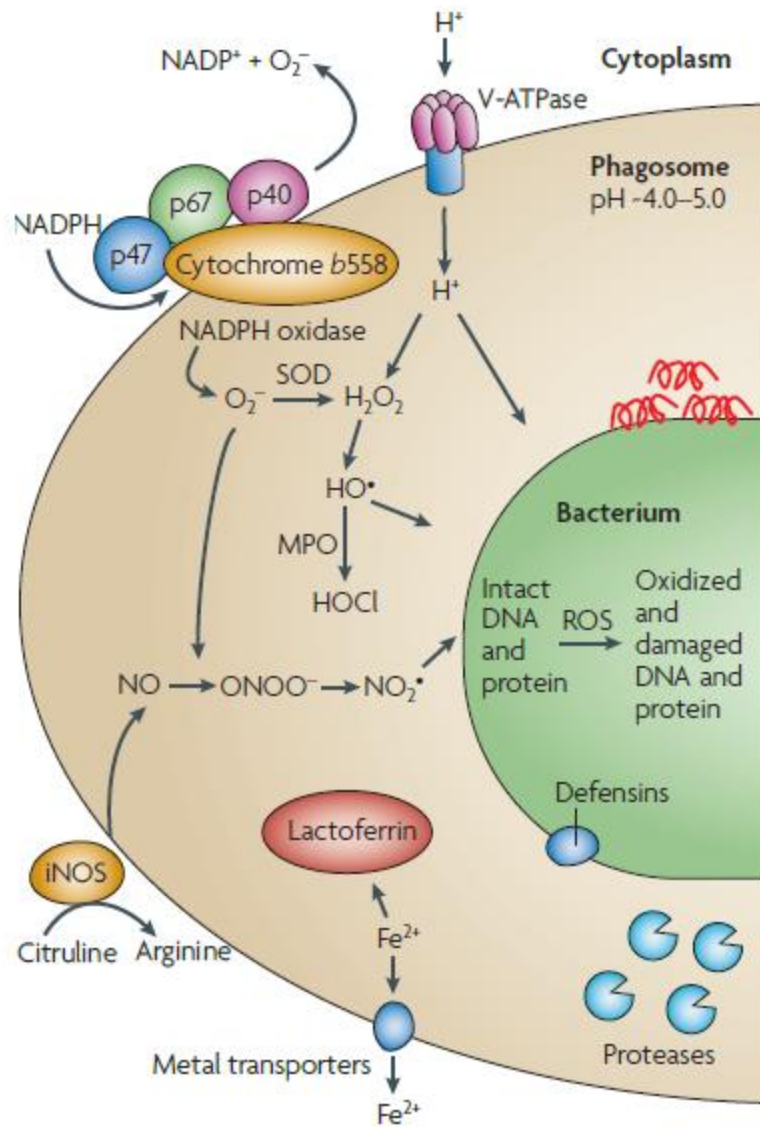


Fig. 3 Mecanismos antimicrobianos de los fagocitos. Los mecanismos bactericidas de los fagocitos incluyen a NOX2 (conocido también como CYBB) NADPH oxidasa, el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), exportadores y scavengers de hierro, como lactoferrina y NRAMP1 (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*) péptidos antimicrobianos y proteínas que permeabilizan y degradan al patógeno (Tomado de Flannagan *et al.*, 2009).

1.4 REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR microRNAs

El estudio de la regulación de la expresión génica mediante microRNAs (miRNAs) ha contribuido a mejorar la comprensión de la función y expresión del genoma de los mamíferos. Estudios recientes han indicado que los miRNAs tienen un papel muy importante en diversos eventos biológicos, como el desarrollo, la proliferación y diferenciación celular, apoptosis, transducción de señales, tumorigénesis, interacciones hospedero-patógeno, entre otros (O'Connell *et al.*, 2010).

Los miRNAs son RNAs pequeños, de 20-25 nucleótidos de longitud, no codificantes que regulan la expresión de sus RNA mensajeros (mRNAs). Más de 1500 miRNAs han sido descubiertos en el genoma humano y, cada miRNA, tiene el potencial para reprimir la expresión de miles de mRNAs. Los miRNAs regulan a sus mRNAs mediante la interacción, por emparejamiento de bases, entre la región semilla del miRNA con la secuencia complementaria del mRNA blanco. La supresión de la expresión génica, mediada por miRNAs, se da por la inhibición de la traducción o por la degradación del mRNA (O'Connell *et al.*, 2010; Lin & Gregory, 2015).

Las células del sistema inmune innato, como los granulocitos, monocitos (que se diferencian en DCs o macrófagos) y células NK, proveen la primera e importante línea de defensa contra las infecciones. Muchos estudios han mostrado que los factores de transcripción involucrados en la monocitopoyesis están regulados por, y/o regulan, miRNAs específicos. Durante la granulopoyesis, el miR-223 fue altamente inducido por el factor de transcripción C/EBP α (*CCAAT enhancer binding protein α*), que a su vez resultó en la represión de los factores de transcripción: Factor Nuclear tipo-A (NFI-A) y E2F1, mejorando la diferenciación de granulocitos (Fazi F *et al.*, 2005). Por otro lado, la monocitopoyesis es controlada por un circuito comprendido por los miR-17-5p, miR-20a, miR-106a, el factor de transcripción 1 relacionado a Runt (Runx1) y el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR); ya que, durante la monocitopoyesis, la expresión de estos miRNAs está disminuida, mientras que la expresión de su gen blanco, Runx1, está aumentada y promueve la expresión de M-

CSFR, quien participa de manera importante en la diferenciación y maduración de monocitos-macrófagos (Fontana *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha demostrado que la expresión de diversos miRNAs se desregula en respuesta al estímulo con citocinas inflamatorias o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). En monocitos humanos, estimulados con lipopolisacárido (LPS), el miR-146, se sobreexpresa y actúa como un regulador negativo de la señalización de receptores tipo Toll (TLR's); ya que, tiene como blanco al Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF-6) y a la cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK1) (Taganov *et al.*, 2006). En otro estudio, se observó que el miR-21 regula negativamente la señalización de TLR4 mediante la inhibición de la actividad del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B). Además, en la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), el miR-21, suprime la producción de interferón tipo I; ya que, tiene como blanco a IRAK1 y MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) (Sheedy *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013).

En macrófagos, la respuesta inflamatoria a la infección involucra la sobreexpresión de varios microRNAs, como: miR-155, miR-146, miR-147, miR-21 y miR-9; entre otros. En macrófagos derivados de médula ósea, la expresión del miR-155 fue inducida como respuesta a varios ligandos de TLR y a citocinas proinflamatorias (O'Connell *et al.*, 2007). En células dendríticas, el knock-down de la expresión del miR-155, incrementa significativamente la expresión de la proteína IL-1 β (Ceppi M *et al.*, 2009).

1.4.1 Biogénesis de microRNAs

La mayoría de las secuencias de DNA en el genoma humano que codifican miRNAs son intergénicas u orientadas en anti sentido a genes vecinos. Los transcritos primarios (pri-miRNA) son generados por la RNA polimerasa II y, datos recientes, indican que los pri-miRNAs poseen un cap 5'-7-metilguanosina y están poliadenilados. Este pri-miRNA, está caracterizado por una estructura de tallo-burbuja (*stem-loop*), que es reconocida por la RNasa III nuclear, Drosha, y su cofactor, DGCR8 (DiGeorge

síndrome critical región protein 8), una proteína de unión a RNA de doble cadena. Drosha corta asimétricamente ambas cadenas del tallo-burbuja, cerca de la base del pri-miRNA, para generar un pre-miRNA de 60 a 70 nucleótidos de longitud, un 5' fosfato y 2 nucleótidos salientes en el extremo 3', permanecen en la base del tallo de este pre-miRNA. Estos son exportados al citoplasma por la exportina-5, de manera Ran GTP-dependiente y, una vez en el citoplasma, una segunda RNasa III, Dicer, actúa en el pre-miRNA. El dominio PAZ de Dicer, reconoce los 2 nucleótidos salientes del extremo 3' del *stem-loop* del pre-miRNA; Dicer corta el otro extremo del pre-miRNA, eliminando el *loop* y generando un miRNA dúplex maduro de doble cadena de 22 nucleótidos de longitud. Subsecuentemente, una cadena del miRNA dúplex, la cadena guía, es unida por una proteína Argonauta (AGO) e incorporada al complejo de silenciamiento inducido por miRNA, o miRISC. Una vez cargado en el complejo, el miRNA maduro puede interactuar con la región 3' sin traducir (UTR) de su mRNA blanco. La región semilla del miRNA (2-8 nucleótidos), es crucial para el reconocimiento del mensajero. El grado de complementariedad entre la región semilla del miRNA y la región 3'UTR del mRNA blanco, determina el mecanismo de regulación: represión de la traducción o degradación (O'Brien *et al.*, 2018; Meister & Tuschl, 2004; Gregory & Shiekhattar, 2005; Huang *et al.*, 2011; Lin & Gregory, 2015).

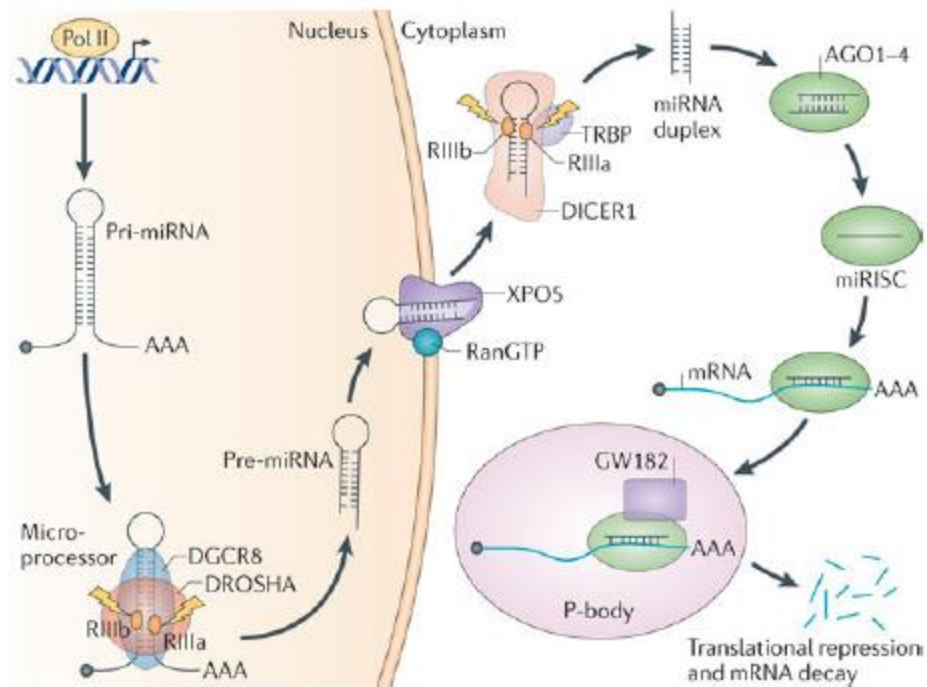


Fig. 4 Biogénesis de microRNAs. Los genes de microRNA son transcritos como miRNAs primarios (pri-miRNAs) por la RNA polimerasa II, en el núcleo. El pri-miRNA es cortado por el microprocesador que incluye a Drosha y DGCR8, para producir un miRNA precursor (pre-miRNA), de 60-70 nucleótidos. El pre-miRNA es entonces exportado del núcleo al citoplasma por la exportina 5 y procesado por Dicer, que produce un miRNA maduro. Una de las cadenas del miRNA maduro (cadena guía) es cargada en el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC) para unirse por complementariedad de secuencia a su mRNA blanco y regular su expresión, ya sea por degradación del mRNA blanco o por reprimir el proceso de traducción (Tomado de Lin & Gregory, 2015).

1.4.2 miRNAs en infección por *Mycobacterium tuberculosis*

Diversos estudios han demostrado que los miRNAs tienen un importante papel en las interacciones patógeno-hospedero en la infección con *M. tuberculosis*. Tal es el caso del miR-155; se ha sugerido que este microRNA facilita el crecimiento intracelular de la bacteria en macrófagos infectados. Sin embargo, la evidencia también demuestra que

el miR-155 tiene la capacidad de promover la eliminación de este patógeno (Rothchild *et al.*, 2016; Kümar *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Así mismo, en células THP-1 infectadas con *M. tuberculosis*, el miR-30A es sobreexpresado, este, tiene como blanco directo a MyD88; por lo que, la sobreexpresión de este miRNA inhibe la activación TLR/MyD88 y la expresión de citocinas. Por otra parte, la infección de *M. tuberculosis* desregula la expresión del miR-let-7f, quien inhibe a A20, suprime la vía de NF- κ B y la producción de citocinas proinflamatorias, lo que favorece la sobrevivencia de la bacteria (Wu *et al.* 2017; Kumar *et al.*, 2015). En pacientes con TB pulmonar activar, se estudió la huella de expresión de miRNAs en el sobrenadante de esputo, encontrando 95 miRNAs diferencialmente expresados; entre ellos miR-3179, miR-19b-2* y miR-147. Este último, se ha visto involucrado en la vía de señalización de TLRs/NF- κ B, atenuando la expresión de citocinas proinflamatorias (Yi *et al.*, 2012).

Por otro lado, Meng y cols. (2014) evaluaron la expresión de miRNAs relacionados a LTBI en macrófagos U937 que expresan la proteína Hsp16.3 (antígeno asociado a latencia), encontrando que 149 miRNAs fueron diferencialmente expresados; de los cuales, cuatro fueron validados en muestras de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LTBI. Estos resultados indican que la expresión de miRNAs podría jugar un papel importante en la infección latente por *M. tuberculosis*. De igual forma, un estudio en macrófagos humanos infectados con cepa W/Beijing y cepa W/no-Beijing, reveló que 14 microRNAs diferencian la infección entre estas cepas; es decir, la virulencia de la cepa puede alterar la respuesta inmune del hospedero (Zheng, 2015).

Con la finalidad de prevenir, diagnosticar y tratar la TB, se han estudiado los niveles de expresión de los miRNAs para obtener biomarcadores efectivos de la enfermedad. Wang y cols. (2011) estudiaron el rol de los microRNAs en la transición de LTBI a TB activa. Ellos encontraron que 17 miRNAs fueron diferencialmente expresados; la mayoría fueron sobreexpresados en TB activa, entre ellos: miR-223, miR-424, miR-451 y miR-144. Asimismo, se demostró que el miR-197 fue expresado diferencialmente, en

suero, entre pacientes con TB pulmonar y controles sanos. Por otro lado, se demostró que seis miRNAs: miR-378, miR-483-5p, miR-22, miR-29c, miR-101 y miR-320b, podrían servir como biomarcadores entre, TB pulmonar y, neumonía, cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar crónico-obstructiva y controles sanos (Abd-El-Fattah *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

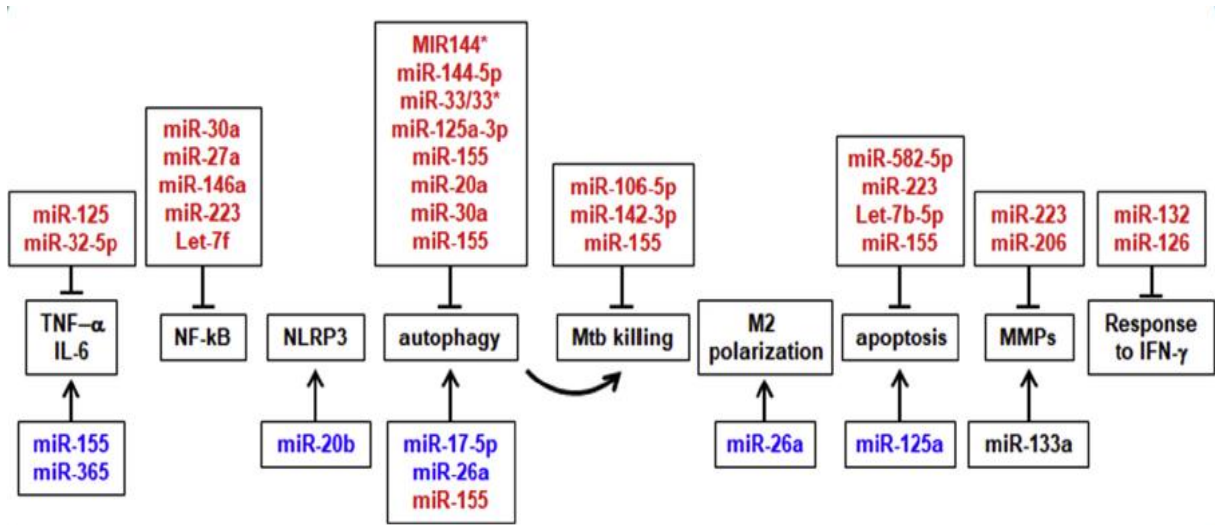


Fig. 5 MicroRNAs en infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Se muestran algunos de los microRNAs que participan en la regulación de la respuesta inmune del hospedero ante la infección por *M. tuberculosis*, promoviendo o inhibiendo mecanismos celulares importantes para eliminar al patógeno. Aquellos marcados con rojo indican sobreexpresión y, azul, los miRNAs subexpresados (Tomado de Yang *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES.

La tuberculosis (TB) una enfermedad crónica infecciosa, causada por *M. tuberculosis* siendo una importante causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Los macrófagos son la primera línea de defensa contra la infección por *M. tuberculosis*, sin embargo, las micobacterias pueden residir y replicarse dentro de ellos, evitando ser eliminadas por los mecanismos de defensa del Sistema Inmune Innato (McClean & Tobin, 2016).

Los miRNAs son RNA pequeños no codificantes de 20-22 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión de mRNA blanco a nivel postranscripcional, uniéndose a la región 3' UTR. Son reguladores importantes involucrados en la modulación de diversos procesos biológicos y patológicos a través de la inhibición de la traducción o inducción de la degradación de sus mRNAs blanco. La desregulación en la expresión de los miRNAs puede resultar en el desarrollo de alguna patología, por ejemplo cáncer, desordenes en la respuesta inmune e inflamación; o bien, pueden contribuir al establecimiento una infección crónica, como la tuberculosis (Tu *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017; Li & Zhang, 2019).

En la actualidad, existe gran variedad de miRNAs que están involucrados en la infección por *M. tuberculosis*. Uno de ellos es el miRNA-29, el cual se sobreexpresa después de la infección por *Mycobacterium* en distintos tipos de celulares. Además, el miR-29 suprime la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, regulando negativamente a IFN- γ . Dentro de este conjunto de miRNAs también encontramos al miRNA-147, se ha visto que es inducido por la vía de señalización TLR/NF- κ B en macrófagos y atenúa la expresión de citocinas proinflamatorias, como *tnf- α* e *il-6*, indicando que miR-147 tiene potentes propiedades antiinflamatorias (Harapan *et al.*, 2013).. Asimismo, se ha visto que el miRNA-21 inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias y promueve la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Sheedy *et al.*, 2010). En un estudio reciente, se encontró que, después de la infección por *M. bovis* BCG, tanto *in*

vitro como *in vivo*; el miR-21 está sobreexpresado en macrófagos y DCs no sensibilizados, a través de la vía de señalización TLR/Erk/NF- κ B. Y también se ha visto sobreexpresado en macrófagos estimulados con ESAT-6 de *M. tuberculosis*. Interesantemente, el miR-21 promueve la apoptosis en DCs infectadas con *M. tuberculosis*, mediante la regulación de Bcl-2 (Wu *et al.*, 2012). Así mismo, recientes estudios con *M. avium* en macrófagos humanos revelaron que los miR-let-7e y miR-29a tienen como blancos a la caspasa 3 y 7, respectivamente, quienes están involucradas en el proceso de apoptosis. Lo anterior sugiere que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de regular la apoptosis (Sharbati *et al.*, 2011).

Así mismo, en DCs murinas deficientes de MyD88, la estimulación con *M. tuberculosis* pero no con LPS, induce la sobreexpresión del miR-99b; asimismo, la inhibición de la expresión de este microRNA resulta en un decremento en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β (Singh *et al.*, 2013). Otro microRNA implicado en la infección por *M. tuberculosis*, es el miR-125; ya que se observó que macrófagos humanos incubados tanto con *M. tuberculosis* como con LAM, induce una alta expresión de este miRNA y una producción de TNF- α baja. El miR-125b se une directamente al 3' UTR del transcrito de *tnf- α* , contribuyendo a la inhibición de la traducción, y posiblemente, a su degradación acelerada, regulando así la expresión de la proteína (Rajaram *et al.*, 2011).

Por otro lado, el miR-155, codificado en el gen *Bic*, ha sido identificado como un miRNA multifuncional; ya que participa en gran diversidad de procesos biológicos, que incluyen apoptosis, inflamación, etc. y se ha convertido en un regulador crucial de la respuesta inmune innata o adaptativa. El miR-155, tiene como blanco a SOCS-1 (*Suppressor of cytokine signaling-1*), incrementando la producción de IFN- γ en células T CD4⁺ y CD8⁺ (Dudda *et al.*, 2013; Huffaker *et al.*, 2012); se ha sugerido también que este microRNA promueve la diferenciación Th17, mediante *Jarid2* (*Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2*) (Escobar *et al.*, 2014); así mismo, la infección por *M. tuberculosis* induce la expresión del miR-155, quien regula la respuesta inmune innata

atenuando la expresión de *Bach1* (*BTB and CNC homology 1*) y *Ship1* (*SH2-containing inositol 5'-phosphatase*) (Kumar *et al.*, 2012). Otras investigaciones han indicado que la inhibición de SHIP1, mediada por el miR-155 está asociada a la alta producción de ROS en macrófagos infectados con *M. bovis* BCG. Además, el miR-155 inhibe la expresión de la ciclooxigenasa 2 (*Cox2*) e Interleucina-6 (*il-6*), suprimiendo la respuesta inflamatoria en macrófagos. Un estudio más reciente mostró que la infección con *M. marium* resulta en el incremento de la expresión del miR-155, este miRNA, se une al 3' UTR de C/EBPB, un factor transcripcional de la óxido nítrico sintasa (NOS), inhibiendo así la producción de NOS y potenciando la sobrevivencia micobacteriana (Qin *et al.*, 2016;).

En el 2014, el equipo de Ni, demostró que los miR-132 y miR-26a, están sobreexpresados en macrófagos humanos después de la infección por *M. tuberculosis* y que, además, actúan como reguladores negativos del coactivador transcripcional p300; dicha molécula, está involucrada en la vía de señalización de IFN- γ . La inhibición de estos microRNAs lleva a la sobreexpresión de la proteína p300 y mejora la respuesta de macrófagos humanos a IFN- γ (Ni *et al.*, 2014). Por otro lado, Li y cols. (2018) mostraron que la expresión del miR-26b fue marcadamente menor en macrófagos humanos THP-1 infectados con *M. tuberculosis*. Además, se encontró que el miR-26b modula a NF- κ B y la expresión de citocinas proinflamatorias, mediante su unión al 3' UTR del mRNA de *tak1*, conllevando a la disminución de la respuesta inmune (Li *et al.*, 2018). Así mismo, la infección de macrófagos con *M. tuberculosis*, desregula la expresión del miR-let-7f, quien tiene como blanco a A20, un regulador negativo de la vía de señalización de NF- κ B, involucrado en el control de la carga bacteriana y en la mejora de la respuesta inmune (Kumar *et al.*, 2015).

Recientemente, diversas investigaciones han indicado que los miRNAs participan en la inmunoreacción de macrófagos infectados por *M. tuberculosis*; ya que, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune alterando la vía de señalización de TLRs. Tal es el caso de los miR-132, miR-26a, miR-30A, miR-206 y miR-708-5p (Abdalla *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). En un estudio reciente, se observó que el miR-708-

5p se sobreexpresa en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, lo cual conlleva a una disminución en la expresión de TLR4 y a un aumento en la sobrevivencia de *M. tuberculosis* en macrófagos; mientras que, la baja expresión del este miRNA mostró los efectos opuestos; lo anterior, sugiere que el miR-708-5p podría ejercer un efecto antiinflamatorio en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, mediante la regulación de TLR4 (Li & Zhang, 2019). Así como el miR-708-5p, el microRNA-146a es un miRNA antiinflamatorio que regula negativamente la activación de NF- κ B mediante la regulación de *irak1* y *traf6*, además suprime la producción de citocinas proinflamatorias y la eliminación de *M. bovis* BCG en macrófagos vía IRAK/TRAF-6 (Li *et al.*, 2013; Saba *et al.*, 2014).

Estudios previos han demostrado que la autofagia, es un mecanismo por el que la célula fagocítica, puede eliminar a *M. tuberculosis* (Abdalla *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha visto que *M. tuberculosis* puede inhibir la activación de la autofagia y bloquear el flujo autofágico mediante la regulación de la expresión de miRNAs, lo que ayuda a la supervivencia y la colonización de los macrófagos por *M. tuberculosis* (Chen *et al.*, 2015). Se han identificado diversos miRNAs involucrados en este proceso mecánico celular. Tal es el caso del miR-1958, diversos experimentos han mostrado que este miRNA puede inhibir la autofagia al interactuar con el 3' UTR de *atg5*, un gen relacionado con este proceso celular y, de esta manera promueve, la supervivencia de *M. tuberculosis* en macrófagos RAW264.7 (Ding *et al.*, 2019). Así mismo, se observó que la infección con *M. tuberculosis* incrementa la expresión del miR-125a-3p, quien regula a UVRAG (*UV radiation resistance-associated gen protein*), inhibiendo la activación de la autofagia y la respuesta antimicrobiana en macrófagos (Kim *et al.*, 2015). En otros estudios se ha propuesto un mecanismo por el cual las micobacterias inhiben la autofagia inducida por IFN- γ en macrófagos, a través de modificaciones epigénéticas sensibles a mTOR, un regulador crítico de la autofagia, al inducir la expresión de los miR-155 y miR-31 (Holla *et al.*, 2014).

Los humanos cuentan con mecanismos que contribuyen a mantener la homeostasis intracelular y a prevenir el daño causado por los patógenos, denominado

autofagia. Hay dos pasos principales en el proceso autofágico: formación de autofagosomas y maduración de autolisosomas. La autofagia tiene una variedad de funciones que no solo pueden resistir la invasión de patógenos, sino que también regulan el metabolismo de las células. Además, numerosos resultados revelan que los microRNAs están involucrados en la regulación de la autofagia (Li & Zhang, 2019; Ding *et al.*, 2019). Se sabe que la infección de *M. tuberculosis* en monocitos humanos y macrófagos THP-1, induce la expresión del miR-144*/hsa – miR-144-5p; el cual, se une al extremo 3' UTR de *dram2* (*DNA damage regulated autophagy modulator 2*). Durante la autofagia, DRAM2 interactúa con BECN1 (Beclina-1) y UVRAG llevando al desplazamiento de Rubicon, un inhibidor de la maduración de la autofagia (Kim *et al.*, 2017). En pacientes con TB, ratones y macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, el miR-27a es expresado abundantemente. Este microRNA tiene como blanco al transportador de Ca⁺ CACNA2D3, ubicado en el retículo endoplásmico. La regulación de este transportador conlleva a la desregulación de la señalización de Ca⁺, inhibiendo la formación del autofagosoma y promoviendo la sobrevivencia intracelular de *M. tuberculosis*, lo anterior revela una estrategia por la que *M. tuberculosis* incrementa su supervivencia en macrófagos (Liu *et al.*, 2018). De igual manera, *M. tuberculosis* induce la expresión del miR-33, el cual inhibe una serie de moléculas que participan el mecanismo de autofagia (*atg5, atg12, lamp1, lc3b, ampk, fox3, tfeb*) (Ouimet *et al.*, 2016).

Diversas investigaciones han identificado diferentes microRNAs como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de TB. Tal es el caso de los miR-142-3p y miR-21-5p, los cuales se encuentran aumentados en muestras de sangre periférica de pacientes con LTB en comparación con pacientes de TB activa (Wu *et al.*, 2014). También, se propuso que el miR-93-3p es un marcador diagnóstico con gran potencial para distinguir entre LTB y TB activa (Meng *et al.*, 2014). Lu y cols. (2019), identificaron que los miR-29a y miR-500a-3p, así como CDC42, ACTA1, PTEN y FOS, son potenciales biomarcadores y candidatos terapéuticos en la LTBI. Así mismo, los miRNAs: miR-361-5p, miR-889 y miR576-3p, son usados para distinguir pacientes con TB de sujetos sanos y pacientes con otras infecciones microbianas. Todo lo anterior implica que los microRNAs, además de estar involucrados en la regulación de la respuesta inmune

también, tienen gran potencial para servir como biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de la Tuberculosis (Qi *et al.*, 2012).

2.1 Antecedentes particulares

En un estudio en ratones BALB/c infectados intratraquealmente con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* 5186 (cepa hipervirulenta), se realizó un perfil de expresión de microRNAs en el lavado bronquiolo alveolar a los 3, 7 y 14 días post-infección (p.i.) encontrando que, 36 miRNAs se desregulan durante la infección por *M. tuberculosis* H37Rv; mientras que la infección con *M. tuberculosis* 5186 desregula la expresión de 20 miRNAs. Dentro de estos, encontramos a los miR-let-7e, miR-150, miR-148a y miR-200a. Estos dos últimos se encontraron sobreexpresados a los 3, 7 y 14 días p.i. con ambas cepas (datos sin publicar).

2.1.1 microRNA-200a

La familia miR-200 es altamente conservada en vertebrados; la cual, consta de 5 miembros: miR-200b, miR-200a, y miR-429, localizados en una región intergénica del cromosoma 1p36.33; y los miR-200c y miR-141, localizados en el cromosoma 12p13.11 (Fig. 6A). La familia miR-200 está dividida en dos grupos funcionales, basándose en las similitudes de su región semilla. El miR-200b, miR-200c y miR-429 (grupo funcional I) tienen la misma región semilla (AAUACUG), mientras que los miR-200a y miR-141 (grupo funcional II) poseen una región semilla diferentes (AACACUG) pero común a los dos (Fig. 6B) (Humphries & Yang, 2015). Es bien conocido el rol de la familia miR-200 en la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés); ya que mantienen la identidad epitelial, mediante la represión de las moléculas conductoras de la EMT, específicamente ZEB1/2 (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*). Los miembros de esta familia participan también en la adhesión celular tumoral, migración, invasión, metástasis y algunas vías de señalización (Lim *et al.*, 2013). Según lo reportado por Zhao y cols. (2020) en células de cáncer Nasofaríngeo (NPC) la expresión del miR-

200a está disminuida mientras que la expresión de CD47 está incrementada, además la sobreexpresión de este miRNA afecta la proliferación, migración e invasión celular (Zhao *et al.*, 2020).

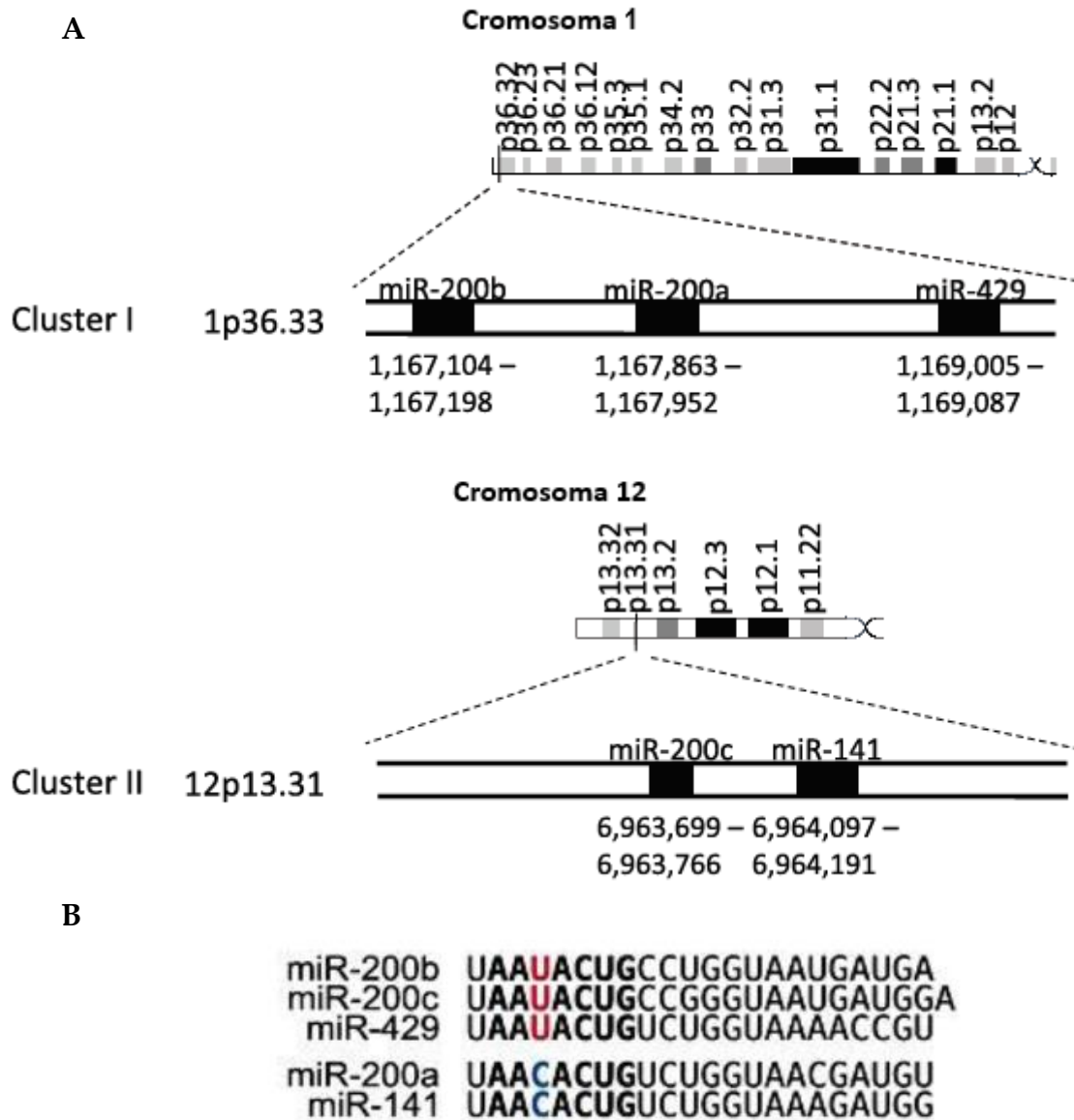


Fig. 6 Familia miR-200. **A.** Los miembros de la familia miR-200 está organizada en dos clústeres: cromosoma 1 (miR-200bc/429) y en el cromosoma 12 (miR-200a/141). **B.** Alineamiento de la región semilla de los miembros de la familia miR-200 (Tomado y modificado de Humphries & Yang, 2015).

El miR-200a, además de estar implicado en la regulación de procesos neoplásicos, también ha sido relacionado con otras patologías. En un estudio realizado en ratas macho Sprague Dawley sometidos a estrés crónico leve y daño nervioso para inducir depresión y dolor crónico, se determinó que la expresión del miR-200a está disminuida después de 4 semanas de tratamiento, mientras que tras 12 semanas de estrés leve prolongado, la expresión del miR-200a se eleva significativamente. Además, un análisis funcional mostró que los genes blancos putativos del miR-200a están relacionados con la vía de señalización de PI3K-AKT, JAK-STAT, Rap1 (*Ras-proximate-1*) y el ciclo de vesículas sinápticas (Satyanarayanan *et al.*, 2019). Es conocido que la activación de células hepáticas estrelladas (HSC) provoca fibrosis hepática, Hu y cols. (2016) demostraron que la sobreexpresión del miR-200a disminuye la proliferación de HSC mediante la regulación de β -catenina, quien está involucrada en la sobrevivencia, proliferación, migración y polaridad celular; sugiriendo que el miR-200a tiene efectos anti-fibróticos mediante la desregulación de β -catenina (Hu *et al.*, 2016). Así mismo, la fibrosis renal es inducida por TGF- β (*Transforming growth factor beta*), quien estimula la EMT. En un modelo *in vitro* se demostró que los miR-200a y miR-141 disminuyen el desarrollo y la progresión de EMT, dependiente de TGF- β , y la fibrosis renal, mediante la regulación de la vía de señalización por TGF- β (Wang B *et al.*, 2011).

La familia miR-200 es una de las familias de miRNAs mejor conocidas en mamíferos; la cual, se ha visto involucrada en la respuesta inmune del hospedero inducida por algún agente patógeno. Niu y cols. (2017) demostraron que la sobreexpresión del miR-200 en tejido hepático infectado con el Virus de la Hepatitis B (VHB) y células HepG2.2.15 infectadas con el virus, disminuye la respuesta antiviral mediada por TLR4, mediante la regulación negativa de MyD88 e IRAK4 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) lo que promueve la infección por VHB (Niu *et al.*, 2017). Por el contrario, se observó que en muestras de tejido de Hepatocarcinoma (HCC) positivo a VHB y células HepG2.2.15 la expresión del miR-200a está disminuida, en comparación con tejido de HCC negativo a VHB o células HepG2, además se relacionó la subexpresión del miR-200a con una alta expresión de la proteína HBx (*Hepatitis B*

virus x protein), la cual juega un papel importante en la progresión de HCC relacionado con la infección por VHB (Shi *et al.*, 2017).

La infección de células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar (A549) con el Virus de Influenza Aviar H5N1, induce sobreexpresión del miR-200c-3p, quien se une al 3' UTR de *ace2* (*Angiotensin-converting enzyme 2*), un regulador negativo del sistema renina-angiotensina. La sub-expresión de *ace2* se ha asociado al Síndrome de Dificultad Respiratorio Agudo, inducido por el Virus de Influenza aviar H5N1. También, demostraron que la inducción de la expresión de este miRNA es dependiente del Factor Nuclear- κ B. Lo antes mencionado, sugiere que la sobreexpresión del miR-200c-3p inducida por la infección de gripe aviar, reduce los niveles de expresión de *ace2*, conduciendo al aumento en los niveles de angiotensina II y al posterior daño pulmonar (Liu *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en macrófagos derivados de monocitos coinfectados con *S. pneumoniae* y Virus de la Influenza A/H1N1, se demostró que la expresión de *cxcl10* o *ip-10* aumenta sinérgicamente después de la coinfección, en comparación con las condiciones de infección individual. Además, se demostró que la expresión del miR-200a-3p fue inducida después de la coinfección, mientras que la transfección con el mimetizador del miR-200a-3p disminuye la expresión de *socs-6* (*Suppressor of cytokine signaling-6*), un conocido regulador de la vía de señalización JAK/STAT, en tanto que la transfección del inhibidor, induce la sobreexpresión de dicho gen, regulando indirectamente la expresión de *cxcl10* o *ip-10* (Hoffmann *et al.*, 2016).

Se conoce que la infección por *Chlamydia muridarum* cepa Nigg_v en ratones C57BL/6 mostró que la expresión de microRNAs involucrados en la mitigación de la fibrosis, está significativamente disminuida; entre estos miRNAs encontramos a los miR-200b, miR-200b-5p, miR-200b-3p y miR-200a-3p. Además, la desregulación de estos miRNAs está asociada con el incremento en la expresión de interleucina-8 (IL-8), *cxcl2* (*C-X-C motif chemokine ligand 2*), interleucina-1 β (IL-1 β), TNF- α e Interleucina-6 (IL-6) (Yeruva *et al.*, 2016).

Lv y cols. (2015), demostraron que el miR-200 regula la actividad antibacteriana en celomocitos primarios de *Apostichopus japonicus*, infectados con *V. splendidus*, mediante su interacción con Tollip (*Toll-interacting protein*), una molécula involucrada en la activación de TLR. Del mismo modo, en respuesta a la infección por el Virus Epstein-Barr (VEB) el miR-200b puede inducir a las células positivas para VEB a la replicación lítica del virus, mediante la regulación negativa de los factores de transcripción, ZEB1/2 (Ellis-Connell *et al.*, 2010). Así mismo, durante la modulación inducida por rapamicina en la nefropatía asociada a VIH, el miR-200 afecta la activación de la vía de mTOR mediante la regulación de *zeb1/2* (Chen *et al.*, 2013).

Un estudio en el 2012 reveló que los miR-200a, miR-200b y miR-200c tienen diversos blancos en la vía de señalización de TLR4 (fig. 7). En células HEK293 transfectadas con mimetizadores del miR-200b y miR-200c, decrece la expresión de MyD88, mientras que los mRNA de *tlr4*, *irak1* y *traf6*, no se ven afectados. Además, la transfección en células THP-1, disminuye la abundancia del mRNA de *myd88*, así como de citocinas proinflamatorias, inducidas por LPS: *il-6*, *cxcl9* y *tnf- α* . Lo anterior sugiere que estos microRNAs actúan como factores que modifican la eficiencia de la vía de señalización de TLR4, a través de MyD88, afectando la respuesta inmune contra patógenos (Wendlandt *et al.*, 2012).

Como ya se ha visto, los miembros de la familia miR-200 (miR-200a/b/c), participan en la regulación de la respuesta inmune durante procesos infecciosos; ya sean bacterianos y/o virales, y podrían estar asociados con la actividad de los macrófagos. A pesar de las diversas investigaciones, aún se desconoce el papel que juega el miR-200a durante la infección por *M. tuberculosis*.

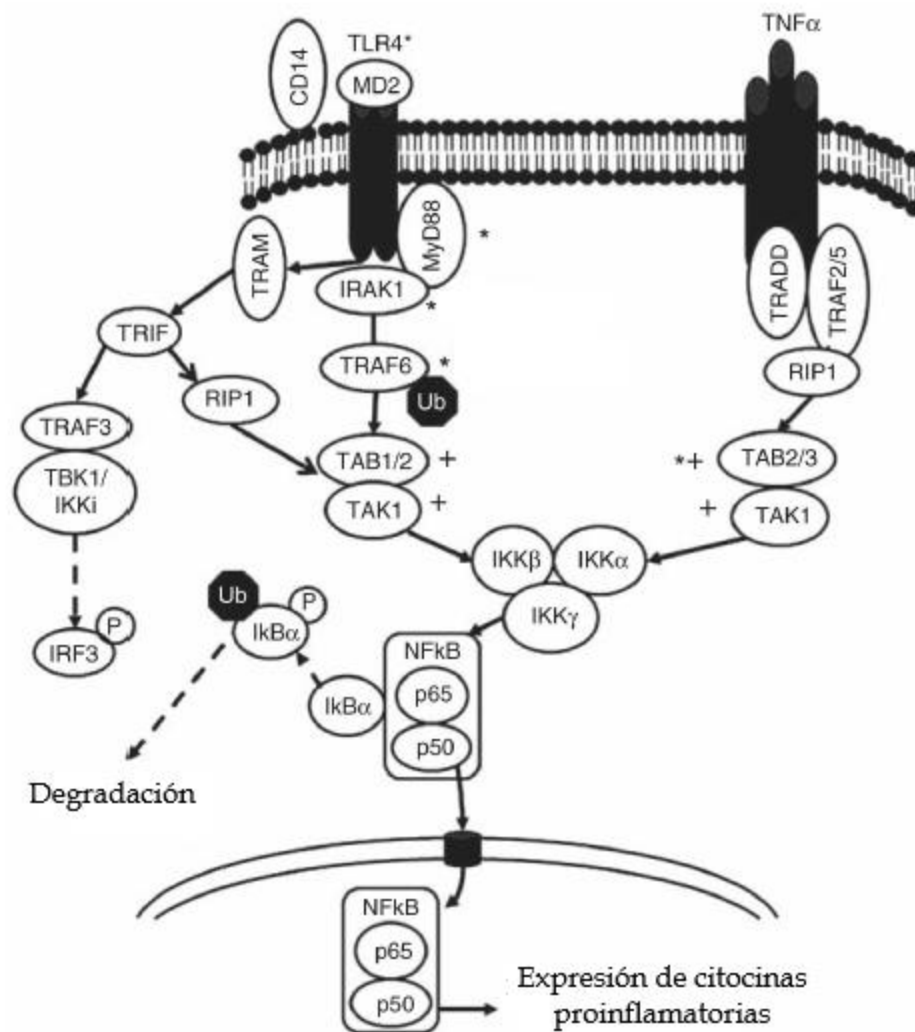


Fig. 7 Genes blancos putativos de la familia miR-200 en la vía de señalización de TLR4. Dicha vía de señalización conlleva a la activación del NF- κ B y a la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias. Se muestran los genes blancos para los miR-200a (+), miR-200b y miR-200c (*) (Tomado y modificado de Wendlandt *et al.*, 2012).

2.1.2 Regulación de la familia miR-200

Se han descrito diferentes factores de transcripción y modificaciones epigenéticas que actúan como elementos clave en la regulación de la familia miR-200.

Regulación por factores de transcripción. Mizuguchi y cols. (2012) mencionan que la regulación de miR-200 vía ZEB1 podría ser modulada por la participación de factores de transcripción como p300 y PCAF. Ellos observaron que la activación de la transcripción de miR-200c/141 ocurre cuando p300 y PCAF interactúan para formar un complejo transcripcional con ZEB1 y, la disrupción de la interacción de p300-PCAF, suprimen la actividad transcripcional (Mizuguchi *et al.*, 2012). Se sabe también que la expresión de miR-200, podría estar regulada por el gen del receptor nuclear *pelp1* (*proline, glutamic acid and leucine rich protein 1*), PELP1 forma un complejo con HDAC2 (*Histone desacetylase 2*), que se une con los promotores de la familia miR-200, desregulando su expresión (Roy *et al.*, 2014). Asimismo, los miembros de la familia de factores de transcripción P53, P63 y P73, regulan directamente la transcripción de miR-200 mediante la unión de P53/P63/P73 a sus sitios de unión en la región promotora de ambos clústeres miR-200 (Fig. 8). Evidencia experimental muestra que los factores de transcripción MYC, OCT4, SOX2 regulan la expresión de esta familia de microRNAs (Knouf *et al.*, 2012).

Regulación por modificaciones epigenéticas. Las metilaciones de citocinas, usualmente en islas CpG localizadas en la región promotoras de los genes, han sido ampliamente documentadas como marcadores de represión de la expresión génica. Las regiones regulatorias de ambos clústeres de miR-200 contienen secuencias ricas en islas CpG (Fig. 8) (Feng *et al.*, 2014). Se sabe que la proteína de adhesión focal Kindlin 2 forma un complejo con DNMT3A (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha*) en el núcleo de células de cáncer de mama para inducir hipermetilación de las islas CpG de los promotores miR-200 para desregular la expresión de la familia miR-200 (Yu *et al.*, 2013). Además de la metilación del DNA, la modificación postraduccional de histonas es otro de los principales mecanismos epigenéticos para regular la expresión de la familia miR-200 (Tellez *et al.*, 2011). El silenciamiento del miR-200b/c ocurre debido a

la metilación en la histona H3 (H3K27me3) y por el incremento en la metilación del DNA. Por otro lado, el complejo hnRNPU/PCAF/RNA Pol II y el RNA largo no codificante H19 (lncRNA-H19) son capaces de activar la expresión de la familia miR-200, vía acetilación de histonas (Zhang *et al.*, 2013).

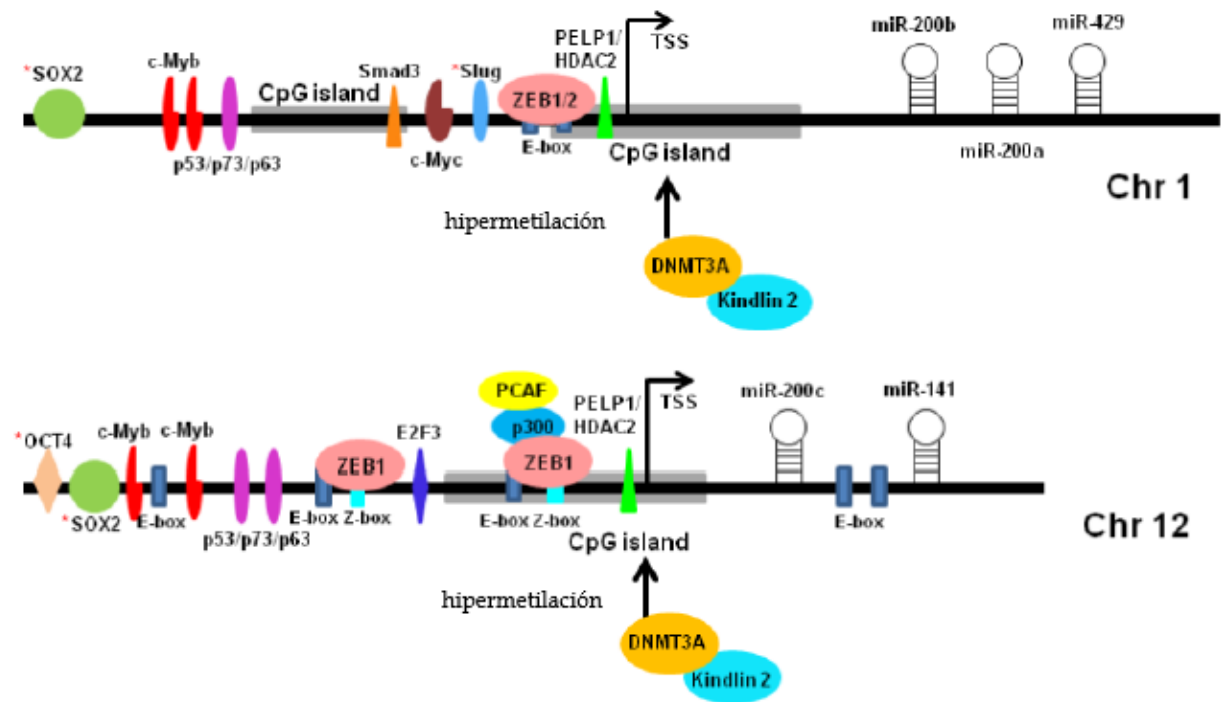


Fig. 8 Regulación de la expresión de la familia miR-200. La regulación de la expresión de la familia miR-200 involucra múltiples factores de transcripción y modificaciones epigenéticas. TSS representa el sitio de inicio de la Transcripción (Tomado de Feng *et al.*, 2015).

3. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del miR-200a en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* favorece la sobrevivencia intracelular del bacilo.

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la importancia de la participación de los miRNAs en la regulación de la respuesta inmune, aún se desconocen muchos aspectos del rol que juegan estas moléculas en la interacción hospedero-patógeno durante la infección por *M. tuberculosis*. Dado que nuestro equipo de trabajo encontró que el miR-200a está sobreexpresado en el lavado bronquiolo alveolar de ratones BALB/c tras 3, 7 y 14 días de infección con *M. tuberculosis* 5186 (cepa hipervirulenta) y *M. tuberculosis* H37Rv (cepa tipo), es de nuestro interés determinar cuál es el papel de este microRNA durante el proceso infeccioso.

5. OBJETIVOS

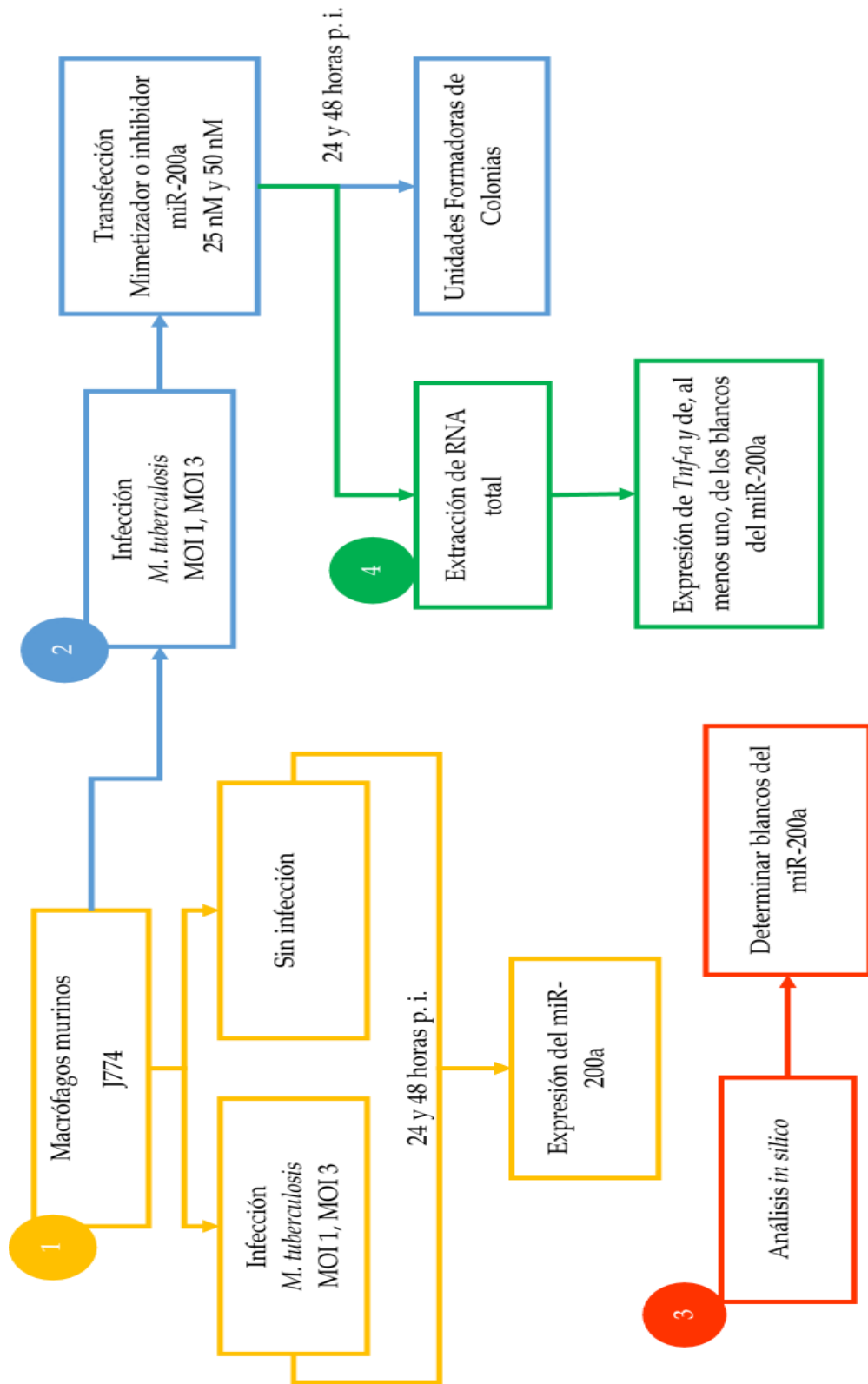
5.1 Objetivo General

Evaluar el papel del miR-200a en el control de la infección por *M. tuberculosis* H37Rv en macrófagos murinos.

5.2 Objetivos Particulares

- Evaluar la expresión del miR-200a en macrófagos murinos J774.
- Determinar el efecto del mimetismo e inhibición del miR-200a en macrófagos J774 en el control de la infección por *M. tuberculosis* H37Rv.
- Determinar los genes blancos putativos del miR-200a asociados a la respuesta inmune.
- Determinar el efecto del mimetismo e inhibición del miR-200a en macrófagos J774 sobre la expresión de TNF- α y alguno de sus genes blancos putativos.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepa de *M. tuberculosis* H37Rv

La cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fue donada por la M. en C. Claudia Carranza Salazar del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Los viales de *M. tuberculosis* donados, pertenecían al mismo lote y se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.2 Línea celular de macrófagos murinos J774

Para los experimentos realizados se utilizó la línea celular J774 (macrófagos derivados de monocitos de tumor de ratón BALB/c). El vial se colocó en hielo frappé y una vez descongelado, la suspensión celular se pasó a un tubo cónico estéril de 15 ml con 10 ml de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) sin suplementar. La suspensión celular se lavó por inversión y se centrifugó durante 5 minutos a 1,200 rpm. A continuación, se descartó el sobrenadante, se colocó medio RPMI-1640 fresco y el pellet se resuspendió mediante pipeteo. Los lavados se repitieron tres veces. Al finalizar el último lavado, el pellet se resuspendió en medio RPMI-1640 suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco™) (RPMI-SFB) y se transfirió a una caja de petri de 100 mm para cultivo celular (Eppendorf). El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una confluencia del 80%.

Para realizar las infecciones con *M. tuberculosis* H37Rv, se retiró el cultivo de la línea celular J774 de la incubadora y se verificó que no hubiera contaminación bacteriana. Se retiró el medio de cultivo, se realizaron tres lavados con RPMI-1640 y las células se incubaron durante 24 horas con medio RPMI-1640 sin suero, con la finalidad de sincronizar el cultivo. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 5 ml de RPMI-1640 y, con ayuda de un ‘scraper’, las células se despegaron de la superficie de la caja de cultivo. La suspensión se homogenizó por pipeteo, se

realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y se sembraron 80,000 células por pozo en una placa de 48 pozos. El volumen del pozo se completó a 250 μ l con medio RPMI-SFB y la placa se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, hasta su uso posterior.

7.3 Infección de macrófagos con *M. tuberculosis* H37Rv

Tomando las medidas de bioseguridad adecuadas, el vial de micobacterias se descongeló en hielo frappé y la suspensión bacteriana se pasó a un criovial con 5 perlas de vidrio estériles. El vial se cerró perfectamente y se vortexeó durante 5 minutos, después se centrifugó a 1,000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml. Se tomó el volumen requerido para preparar la suspensión bacteriana en medio RPMI-1640, para las multiplicidades de infección de 1 y 3 (MOI 1 y MOI 3).

Se retiró la placa con macrófagos murinos de la incubadora, se tomó la suspensión bacteriana correspondiente a las MOI 1 y MOI 3, se goteó en el pozo y los macrófagos infectados se incubaron durante 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la placa se retiró de la incubadora y, sin tocar el fondo del pozo, se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados con medio RPMI-1640, para eliminar las micobacterias no fagocitadas. Al terminar los lavados, se añadieron 250 μ l de medio RPMI-SFB. La placa se mantuvo en incubación a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad, hasta su uso posterior.

7.4 Transfección con el mimetizador e inhibidor del miR-200a

Para la transfección del mimetizador e inhibidor del microRNA-200a, se utilizó como agente de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ocho tubos estériles de 1.5 ml se colocaron 275 μ l de medio Opti-Mem (Gibco™), a cuatro de ellos se les adicionaron 13.75 μ l de Lipofectamina; de los cuatro restantes, a dos se les añadió 13.75 μ l del mimetizador (mirVana® miRNA mimic, Assay ID MC10991) y 13.75 μ l del inhibidor (Ambion®

Anti-miR™ miRNA Inhibitor, Assay ID AM10991), para la concentración de 25nM; por otro lado, a los dos restantes se les agregaron 27.61 µl del mimetizador e inhibidor, respectivamente, para la concentración de 50nM. Los tubos se incubaron durante 10 minutos; posteriormente, se mezcló un tubo de lipofectamina por cada tubo que contenía, ya sea el mimetizador o inhibidor del miR-200a, y se dejaron incubar durante 15 minutos. La placa con macrófagos murinos infectados con *M. tuberculosis*, se retiró de la incubadora y se procedió a la transfección con el mimetizador e inhibidor, goteando 25 µl de la mezcla correspondiente, previamente preparada, según la concentración y condición para cada pozo. Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad durante 24 y 48 horas.

7.5 Extracción de RNA.

Se realizó la extracción de RNA total de las células utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen™) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se retiró el medio de cultivo de cada pozo de la placa, se añadieron 150 µl de TRIzol y se homogenizó por pipeteo. El lisado celular se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml, se agregaron 100 µl de cloroformo, se mezcló por pipeteo y se dejó incubar por 2-3 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó por centrifugación a 12,000 x g a 4° C durante 15 minutos, se transfirió a un tubo estéril nuevo, al cual se añadió 150 µl de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12,000 x g a 4° C durante 15 minutos; se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300 µl de etanol y se centrifugó a 7,500 x g a 4° C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar; una vez seco, el pellet se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas. La preparación se cuantificó en el NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%. El RNA total obtenido, fue sometido a tratamiento con DNasa para eliminar el DNA genómico contaminante, para ello, en un tubo estéril de 0.2 ml se añadió 1 µl de Buffer 10x con MgCl₂, 1 µl de DNasa I libre de RNasa (#EN0521, Thermo Scientific), 500 ng de RNA total y c.b.p 10 µl de agua libre de nucleasas. Se incubó durante 60 minutos a 37° C;

posteriormente, se agregó 1 μ l de EDTA 50mM y se incubó a 65° C por 10 minutos, para inactivar la reacción. El RNA tratado se colocó en hielo, se cuantificó y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%. La preparación se almacenó a -70° C hasta su posterior uso.

7.6 Análisis de la expresión del miR-200a

Para analizar la expresión del miR-200a, se utilizó TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo estéril de 0.2 ml, se colocaron 0.15 μ l de dNTPs (con dTTP) 100 mM, 1 μ l de Multiscribe™ Transcriptasa Reversa (50 U/ μ l), 1.5 μ l de Buffer 10X de transcripción reversa, 0.19 μ l de Inhibidor de RNasa (20U/ μ l), 4.16 μ l de agua libre de nucleasas, 3 μ l de sonda TaqMan® MicroRNA Assays (ID 000502, ThermoFischer Scientific) específica para el microRNA-200a y 5 μ l de la muestra de RNA, cuya concentración fue ajustada a 2 ng/ μ l. La muestra se centrifugó brevemente y se colocó en hielo por 5 minutos. A continuación, la muestra se incubó a 16°C por 30 minutos, 42° C por 30 minutos, 85° C por 5 minutos y a 4° C ∞ . Una vez obtenido el producto de Retrotranscripción (RT), se procedió a la amplificación. Para ello en una placa de reacción de 96 pozos (MicroAmp™, ThermoFisher Scientific), se colocó (por reacción) 1 μ l de TaqMan MicroRNA Assay (20X) (ThermoFischer Scientific), 1.33 μ l del producto de RT, 10 μ l de Máster Mix TaqMan 2X Universal PCR, No AmpErase UNG^a (Applied Biosystems) y 7.67 μ l de agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó por triplicado de cada muestra a evaluar. Se colocó el film adhesivo y la placa de reacción fue centrifugada brevemente para eliminar las burbujas y depositar la muestra en el fondo del pozo. La muestra se colocó en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, del Posgrado en Ciencias Genómicas y se programó con los parámetros mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de amplificación para RT-qPCR.

Paso	Activación de la enzima AmpliTaq Gold®	PCR	
	HOLD	40 ciclos	
		Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
Tiempo	10 minutos	15 segundos	60 segundos
Temperatura (°C)	95	95	60

Se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ para realizar la comparación de la expresión del miR-200a con el control endógeno RNU6 (Cat. No. 4427975, ID 001973, ThermoFisher Scientific). Los datos fueron graficados en GraphPad Prism 8.0.2.

7.7 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias

Para determinar el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv en macrófagos murinos J774. Al término del tiempo de tratamiento, las placas fueron retiradas de la incubadora y, por cada pozo a evaluar, se añadieron 150 μ l de solución de lisis (PBS + 0.01% SDS), se homogenizó por pipeteo y se verificó en el microscopio la lisis de los macrófagos. El lisado celular (~ 450 μ l) fue recuperado en un tubo estéril de 1.5 ml, y a partir del mismo se realizaron 3 diluciones seriadas (1:10) en PBS-T (PBS + Tween-20 0.01%). De cada dilución, se tomaron 10 μ l y se gotearon, por triplicado, en cajas petri con medio de crecimiento Middlebrook 7H10. Las cajas se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y 90% de humedad y se realizó el conteo de las colonias bacterianas cada 5 días. Para estimar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se calculó el promedio de los conteos. En aquella dilución en la que el crecimiento bacteriano fue más homogéneo, se multiplicó por el factor de dilución, se multiplicó por 100 (para llevar el volumen a 1 ml) y, finalmente, por 4.5, para obtener un aproximado del número de

bacterias obtenidas en el lisado celular. Los datos fueron graficados en GraphPad Prism 8.0.2.

7.8 Síntesis de cDNA

Para la transcripción reversa, se utilizó la SuperScript™ III Transcriptasa Reversa (Invitrogen™, Cat. No. 18080-093). Se colocó en un tubo estéril de 0.2 ml, 1 µl de oligo(dT)₂₀, 500 ng de RNA, 1 µl de mix dNTP 10mM y agua libre de nucleasas c.b.p. 13 µl, se mezcló por pipeteo y se incubó a 65°C por 5 minutos, se incubó en hielo por, al menos, 1 minuto; se centrifugó brevemente y se añadieron 4 µl de buffer de síntesis 4x, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de RNasa y 1 µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl). Se mezcló por pipeteo y se incubó a 50° C por 60 minutos. Para inactivar la reacción, la muestra se calentó a 70° C durante 15 minutos y se almacenó finalmente a -20° C hasta su uso posterior. El cDNA sintetizado se utilizó como templado para amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

7.9 Análisis de la expresión de *tnf-α*, *nfkbia* y *tlr4*

Para evaluar la expresión de *tnf-α* y de los genes blanco del miR-200a, *nfkbia* y *tlr4*; se utilizó el cDNA, previamente sintetizado. En un tubo estéril de 0.2 ml, para cada gen a evaluar, se colocaron 5 µl de Máster Mix PCR (Cat. No. 11636103001, Roche), 1 µl del producto de RT, 3 µl de agua libre de nucleasas, 0.5 µl de primer sentido (F) y anti sentido específico (R) específico (Tabla 1).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR.

Gen	Primer		Tm
<i>β-actina</i>	F	5'-ACT-GCC-GCA-TCC-TCT-TCC-TC-3'	55° C
	R	5'-TGC-CAC-AGG-ATT-CCA-TAC-C-3'	
<i>Tnf-α</i>	F	5'-CAT-CTT-CTC-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-A-3'	55° C
	R	5'-TGG-GAG-TAG-ACA-AGG-TAC-AAC-CC-3'	
<i>Nfkbia</i>	F	5'-TTT-ACT-GGG-GTG-ATT-CGG-CT-3'	60° C
	R	5'-CAC-CTG-GCT-CTT-ACA-TGG-GA-3'	
<i>Tlr4</i>	F	5'-ACA-AAA-CTC-TGG-GGC-CTA-A-3'	55° C
	R	5'-ATA-GCT-TAG-CAG-CCA-TGT-GT-3'	

Los tubos con las reacciones se centrifugaron brevemente para depositar la muestra en el fondo del tubo y se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con el programa de ciclado mostrado en la figura 9.

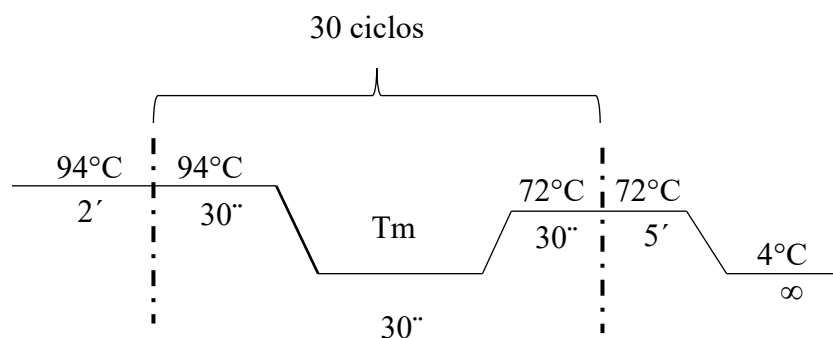


Fig. 9 Esquema del ciclo de PCR.

Al finalizar el programa, los tubos se colocaron en hielo y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón Tris-Acetato-EDTA a 100 V. Los amplicones se visualizaron en Gel Doc™ XR+ Imager (BioRad). Se realizó una densitometría de las bandas, en el programa ImageLab™ Software 6.0.1 (BioRad), para comparar la expresión de *tnf-α*, *nfkbia* y *tlr4* con respecto al control endógeno *β-actina*. Los datos fueron graficados en GraphPad Prism 8.0.2.

7.10 Análisis *in silico*.

Para determinar los genes blancos predichos del microRNA-200a se consultaron las bases de datos MicroRNA (www.microrna.org), TargetScan (www.targetscan.org), miRDB (mirdb.org) y PicTar (pictar.mdc-berlin.de). Se realizó una comparación entre las listas de genes obtenidas de cada base de datos consultada y, aquellos que fueran comunes, en al menos tres, y que además estuvieran relacionados con la respuesta inmune, fueron seleccionados. Por otro lado, se descargaron los archivos suplementarios de la investigación realizada por Andreu *et al.*, 2017. En dichos documentos, se enlistan los genes diferencialmente expresados en macrófagos primarios y macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis*. Se realizó una comparación entre los genes obtenidos en las bases de datos y los que se obtuvieron en la investigación de Andreu y cols. (2017); aquellos genes comunes y relacionados con la respuesta inmune, fueron considerados como candidatos a evaluar. Obtenidos los genes, se realizó un alineamiento entre la región 3' UTR del mRNA blanco predicho y la región semilla del miR-200a para determinar la complementariedad. Asimismo, se diseñaron oligonucleótidos específicos en Primer3 input (versión 0.4.0) para los genes *nfkbia* y *tlr4* para determinar la expresión de, al menos uno de ellos, en nuestro modelo experimental.

7.11 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se calculó media y desviación estándar. Los resultados fueron sometidos a Análisis de varianza (ANOVA) con P-value de 0.05; así como la prueba Tukey, para múltiples comparaciones. Se utilizó la paquetería estadística de GraphPad Prism 8.0.2.

8. RESULTADOS

8.1 Perfil de expresión del miR-200a en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.

Con la finalidad de conocer si el miR-200a, se encontraba desregulado en los macrófagos murinos J774, se evaluó su expresión en macrófagos no infectados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. A las 24 horas p.i. se observó un incremento en la expresión del miR-200a (1.62 fold), en macrófagos infectados con MOI 1 (Fig. 10). Sin embargo, a las 48 horas, la expresión del miRNA decreció casi al nivel basal (0.92 fold). Por otro lado, en macrófagos infectados con MOI 3, a las 24 y 48 horas, se observó que el miR-200a se sobreexpresó 4.72 veces y 5.6 veces, respectivamente, con respecto a macrófagos no infectados. A pesar de que aparentemente el miR-200a se desreguló durante la infección por *M. tuberculosis*, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las condiciones de infección y tiempo p.i. probablemente debido a la dispersión en los datos (Fig. 10).

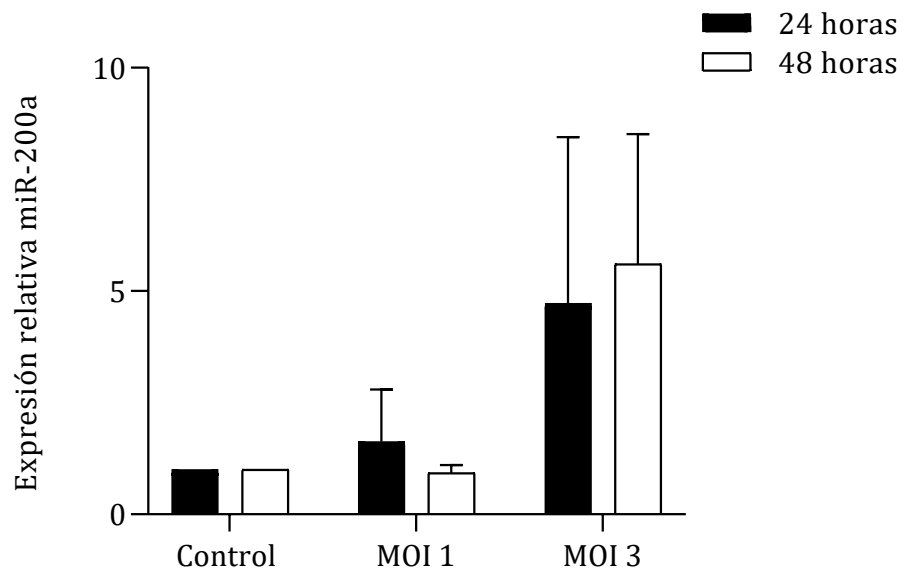


Fig. 10 Expresión del miR-200a en macrófagos J774 infectados con *M. tuberculosis*. La expresión relativa del miRNA fue determinada usando RT-qPCR en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1, MOI 3) durante 24 y 48 horas. La expresión fue normalizada al U6, mediante el método Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$), y reportada como expresión relativa. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.05$, no se encontraron diferencias significativas. Los datos se muestran como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

8.2 Ensayos de mimetismo e inhibición del miR-200a

Para investigar la función del miR-200a en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, se realizó la transfección con el mimetizador y el inhibidor del miR-200a, utilizando las concentraciones de 25 nM y 50 nM. Se observó que después de la transfección con 25 nM del mimetizador, el miR-200a se sobreexpresó hasta 30,000 veces, a las 48 horas; mientras que, la concentración 50 nM del mimetizador aumentó la expresión del miRNA 1075.51 veces, a las 24 horas y, 1325.14 veces, a las 48 horas (Fig. 11). Por otro lado, la transfección del inhibidor, durante 24 horas, no disminuyó la expresión del miRNA con las concentraciones utilizadas. Sin embargo, a las 48 horas, la expresión del miR-200a disminuyó en un 90% con 25 nM del inhibidor, y 30% con 50 nM (Fig. 11).

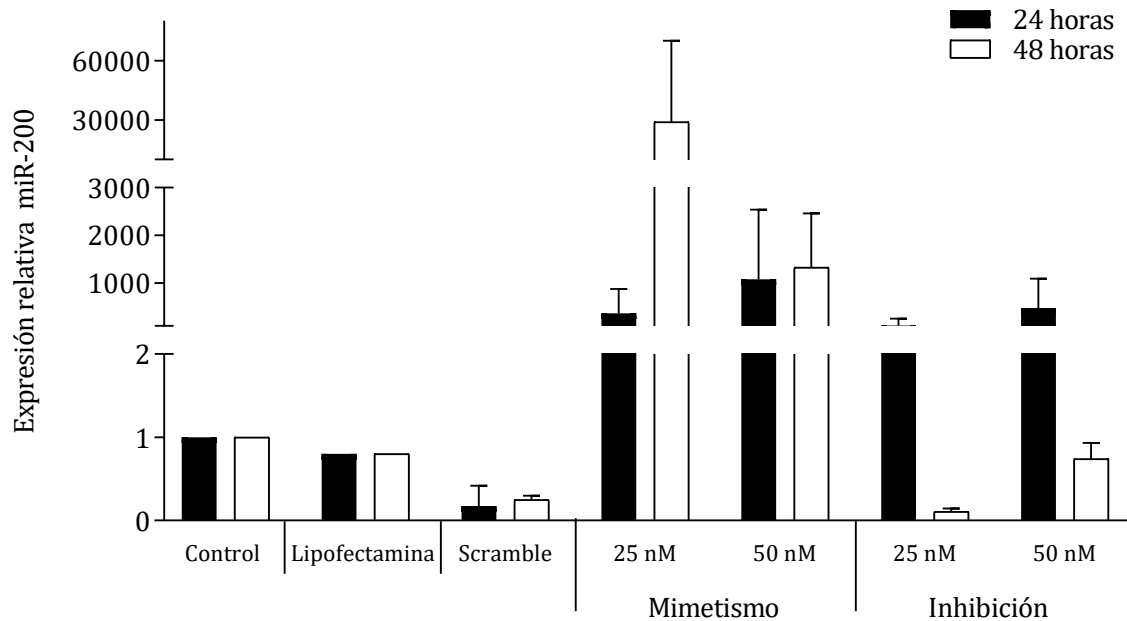


Fig. 11 Mimetismo e inhibición de la expresión del miR-200a. Macrófagos murinos J774 fueron transfectados con el mimetizador e inhibidor del miRNA, a una concentración final de 25 y 50 nM (cada uno), durante 24 y 48 horas. Se utilizó lipofectamina 2000 como agente de transfección. La expresión fue detectada usando RT-qPCR, analizada por el método Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$) y reportada como expresión relativa. Se normalizó usando U6 como control endógeno. Los datos se muestran como la media \pm SD de dos experimentos independientes. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) * $p < 0.05$.

8.3 Efecto del mimetismo y la inhibición del miR-200a sobre el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv

Para evaluar el papel que juega el miR-200a durante la infección por *M. tuberculosis*, se analizó el efecto de su sobreexpresión e inhibición sobre la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis*. En macrófagos murinos J774 transfectados con 25 nM y 50 nM del mimetizador se observó un ligero incremento en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* tras 24 horas utilizando la MOI 1 de infección, en comparación con los macrófagos sin transfectar, pero no así a las 48 horas (Fig. 12A). Por su parte, la transfección con el inhibidor del miR-200a no redujo el crecimiento intracelular de la micobacteria tras 24 horas de transfección (Fig. 12A), mientras que, a las 48 horas, se observó una reducción en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en ambas concentraciones con respecto a los macrófagos no transfectados, pero que no fue estadísticamente significativo ($p=0.05$). Por otro lado, en macrófagos infectados con MOI 3, a las 24 horas se observó que el mimetizador generó un incremento en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* (Fig. 12B) con respecto a los macrófagos sin transfectar, pero tampoco fue estadísticamente significativo ($p=0.05$), sin embargo, el inhibidor no generó disminución en el crecimiento intracelular del bacilo (Fig. 12B).

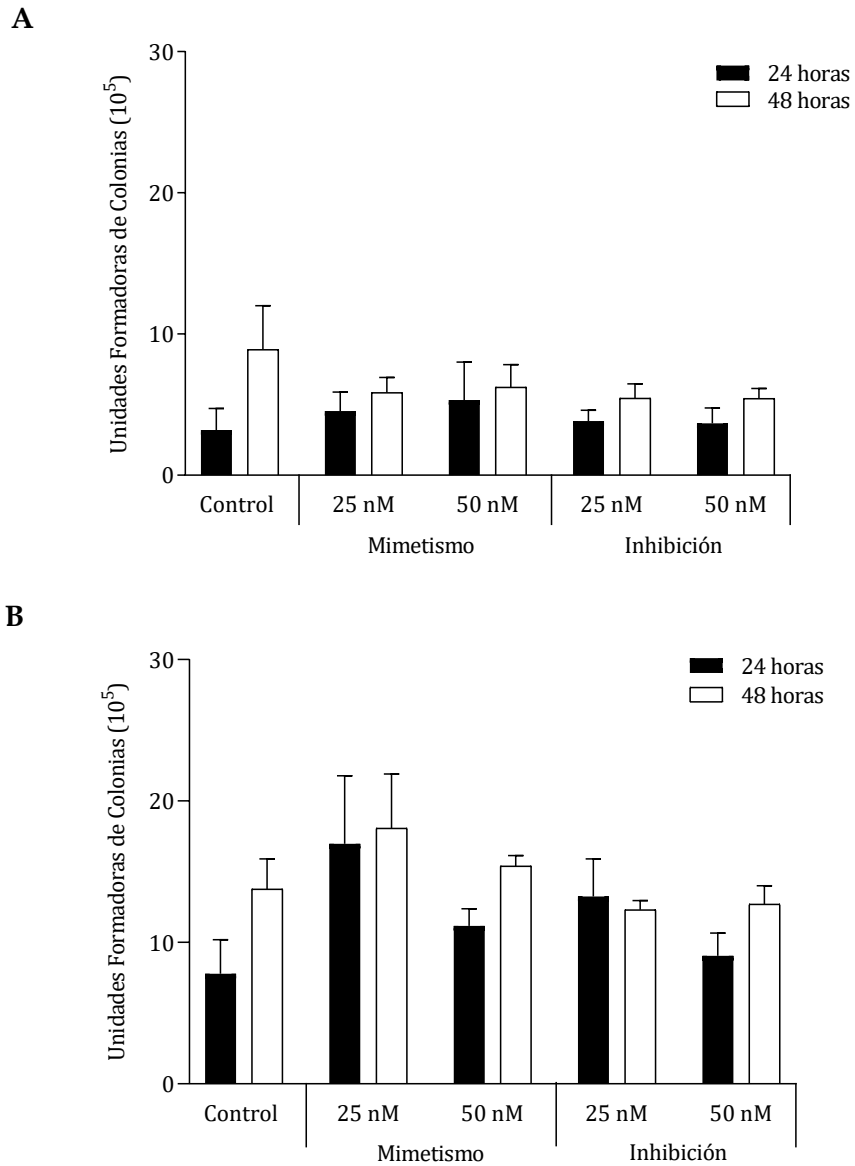


Fig. 12 Crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*. Macrófagos murinos J774 fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1, MOI 3) y transfectados con el mimetizador e inhibidor [25 nM, 50 nM] del miR-200a, durante 24 y 48 horas; los lisados celulares se sometieron a la detección de UFC. **A. MOI 1 B. MOI 3.** Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA).

8.4 Análisis *in silico*

Del total de genes predichos en las bases de datos para el miR-200a, se encontró que 60 genes son comunes en al menos dos de ellas: 51/7645 microRNA.org; 45/675 TargetScan; 43/939 miRDB y 16/430 Pictar (Anexo 2). Asimismo, 44 de 3147 genes expresados diferencialmente durante la infección por *M. tuberculosis* (Andreu *et al.*, 2017) son comunes con los predichos por las bases de datos (Anexo 2). Se seleccionaron 14 genes como blancos potenciales del miR-200a (Tabla 3). Dichos genes están involucrados en procesos como la activación del Factor Nuclear κ B, señalización por TNF- α , señalización por TLRs, activación de PI3K/AKT, apoptosis, señalización por Rho GTPasas. Finalmente, se eligió a *tlr4* y *nfkbia* para medir su expresión en macrófagos murinos infectados y transfectados.

Se verificó que la región semilla del miR-200a (5'-AACACUG-3') se uniera a la región 3' UTR de los genes *tlr4* y *nfkbia*, para ello se usó la base de datos TargetScan. En la figura 13A, se muestra el sitio de hibridación del miR-200a en la región 3' UTR de *tlr4* (posición 759-766); además, se determinó que el miRNA se une en la posición 356 a 362 del 3' UTR del mRNA de *nfkbia* (Fig. 13B).

Tabla 3. Genes blanco predichos del miR-200a. Se muestra el símbolo del gen, nombre, número de acceso en <http://www.ensembl.org/> y las rutas de señalización en las que participan

miRNA	Gen	ID	Pathway	
miR-200a	Dlc1	ENSG00000164741 ENSMUSG000000031523	Signaling by Rho GTPases	
	Nfkbia	ENSG00000100906 ENSMUSG000000021025	NF-κB of activación, TNF-α signaling, TLR signaling, apoptosis	
	Nfkbie	ENSG00000146232 ENSMUSG00000023947		
	Nfkb2	ENSG00000077150 ENSMUSG00000025225		
	Irak2	ENSG00000134070 ENSMUSG00000060477		
	Tab1	ENSG00000100324 ENSMUSG00000022414		
	Stat5a	ENSG00000126561 ENSMUSG00000004043		
	Tlr4	ENSG00000136869 ENSMUSG00000039005		
	MyD88	ENSG00000172936 ENSMUSG00000032508		
	Bcl2a1d	ENSMUSG00000099974		
	Tgfbr1	ENSG00000106799 ENSMUSG00000007613		
	Pik3ca	ENSG00000121879 ENSMUSG00000027665		Apoptosis
	Pik3r1	ENSG00000145675 ENSMUSG000000041417		PI3K/ AKT activation

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile
A				
Position 759-766 of TLR4 3' UTR	5' ...UGGAUGUCACAGAGUCAGUGUUA...	8mer	-0.20	93
mmu-miR-200a-3p	3' UGUAGCAAUGGGUCUGUCACAAU 			
B				
Position 356-362 of NFKBIA 3' UTR	5' ...CAUGUAAACAGCCAGGAGUGUUA...	7mer-A1	-0.08	77
hsa-miR-200a-3p	3' UGUAGCAAUGGGUCUGUCACAAU 			

Fig. 13 Alineamiento del miR-200a con sus genes blanco. Sitios de unión predichos del miR-200a y la región 3' UTR de *tlr4* (A) y *nfkbia* (B). Se utilizó la base de datos TargetScan (www.targetscan.org).

8.5 Análisis de la expresión de *tnf-α*

La evaluación de la expresión de *tnf-α* mostró que a las 24 horas aumenta su expresión cuando se sobreexpresa el miR-200a (25 nM del mimetizador) en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (MOI 1); dicho aumento es mayor al utilizar la concentración 50 nM del mimetizador (Fig. 14). Por otro lado, la inhibición del miRNA, con 50 nM del inhibidor resultó en una expresión menor del *tnf-α* (Fig. 14). Mientras que a las 48 horas, la expresión de *tnf-α* se incrementó al sobreexpresar el miR-200a (50 nM del mimetizador), aunque el efecto fue mayor al utilizar la concentración de 25 nM. Por su parte, la expresión de *tnf-α* disminuye al inhibir el miR-200a al utilizar 25 nM del inhibidor, pero no así con 50 nM de este (Fig. 14).

La expresión de *tnf-α* a las 24 horas en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (MOI 3) es similar al utilizar 25 nM o 50 nM del mimetizador, en cambio, la inhibición del miR-200a con 25 nM del inhibidor específico, resultó en una expresión menor de *tnf-α*. Por otro lado, a las 48 horas, la sobreexpresión del miR-200a (utilizando 50 nM del mimetizador) aumentó la expresión del *tnf-α*, siendo mayor al utilizar 25 nM del mimetizador. Al inhibir el miR-200a con 25 nM del inhibidor, la expresión de la citocina *tnf-α* es menor en comparación a cuando se utiliza 50 nM del inhibidor específico (Fig. 15).

Estos resultados mostraron que a las 48 horas la expresión del *tnf-α* en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, con MOI 1 y MOI 3, aumentó al sobreexpresar el miR-200a (50 nM del mimetizador) siendo mayor al utilizar 25 nM del mimetizador, en comparación con la expresión de *tnf-α* en macrófagos no transfectados. De igual manera, la inhibición del miR-200a con 25 nM del inhibidor específico resulta en una menor expresión del *tnf-α* en comparación con macrófagos no transfectados (Fig. 14E, 15E)

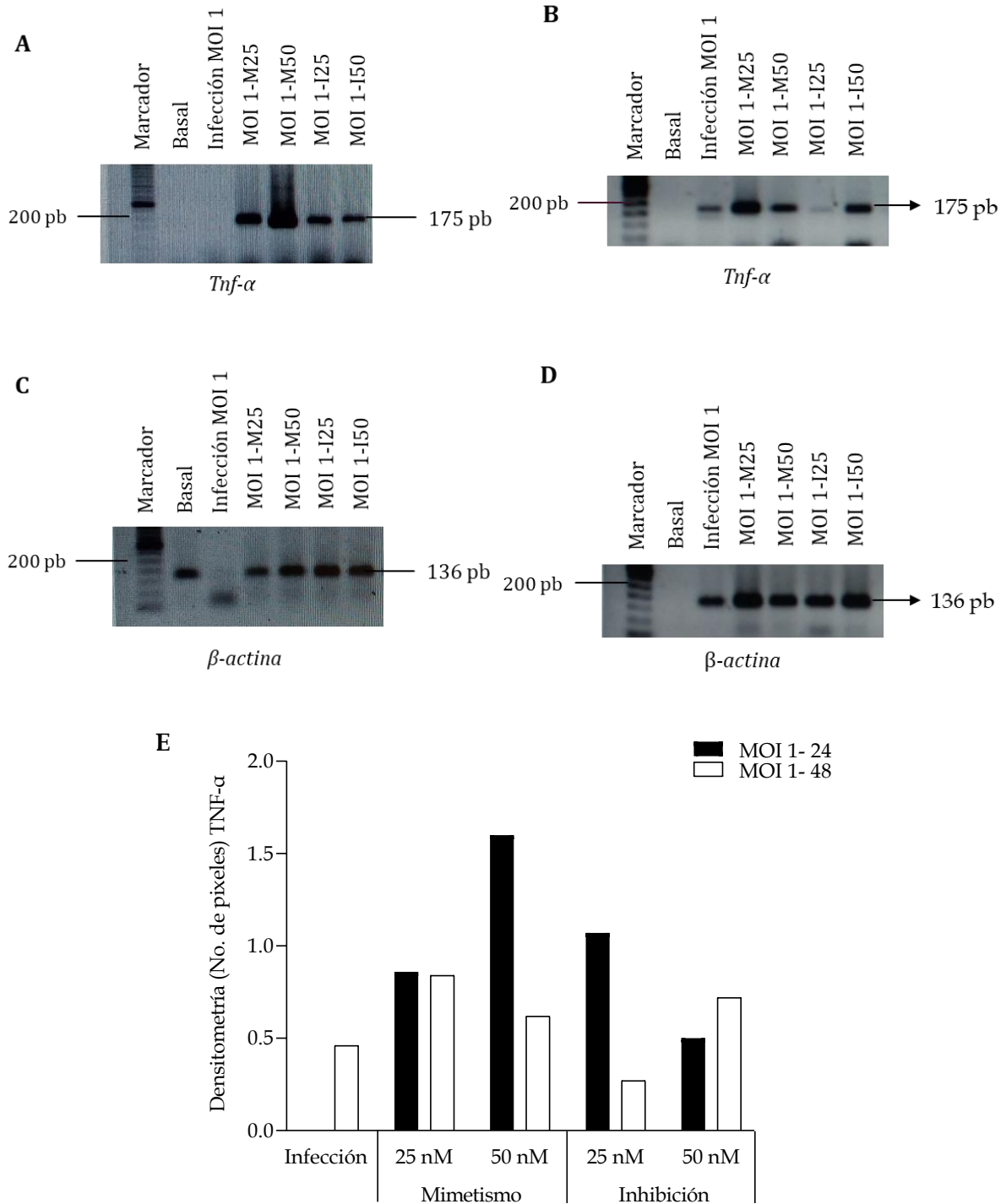


Fig. 14 Expresión de *tnf-α* en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* MOI 1. Macrófagos murinos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1) y transfectados con mimetizador e inhibidor del miR-200a (25 y 50 nM) durante 24 y 48 horas. Se observa el producto de PCR punto final, verificado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%. **A.** *Tnf-α*, MOI 1- 24 horas **B.** *Tnf-α*, MOI 1 **C.** *β-actina*, MOI 1- 24 horas **D.** *β-actina*, MOI 1- 48 horas **E.** Densitometría, los datos se expresan como número de píxeles.

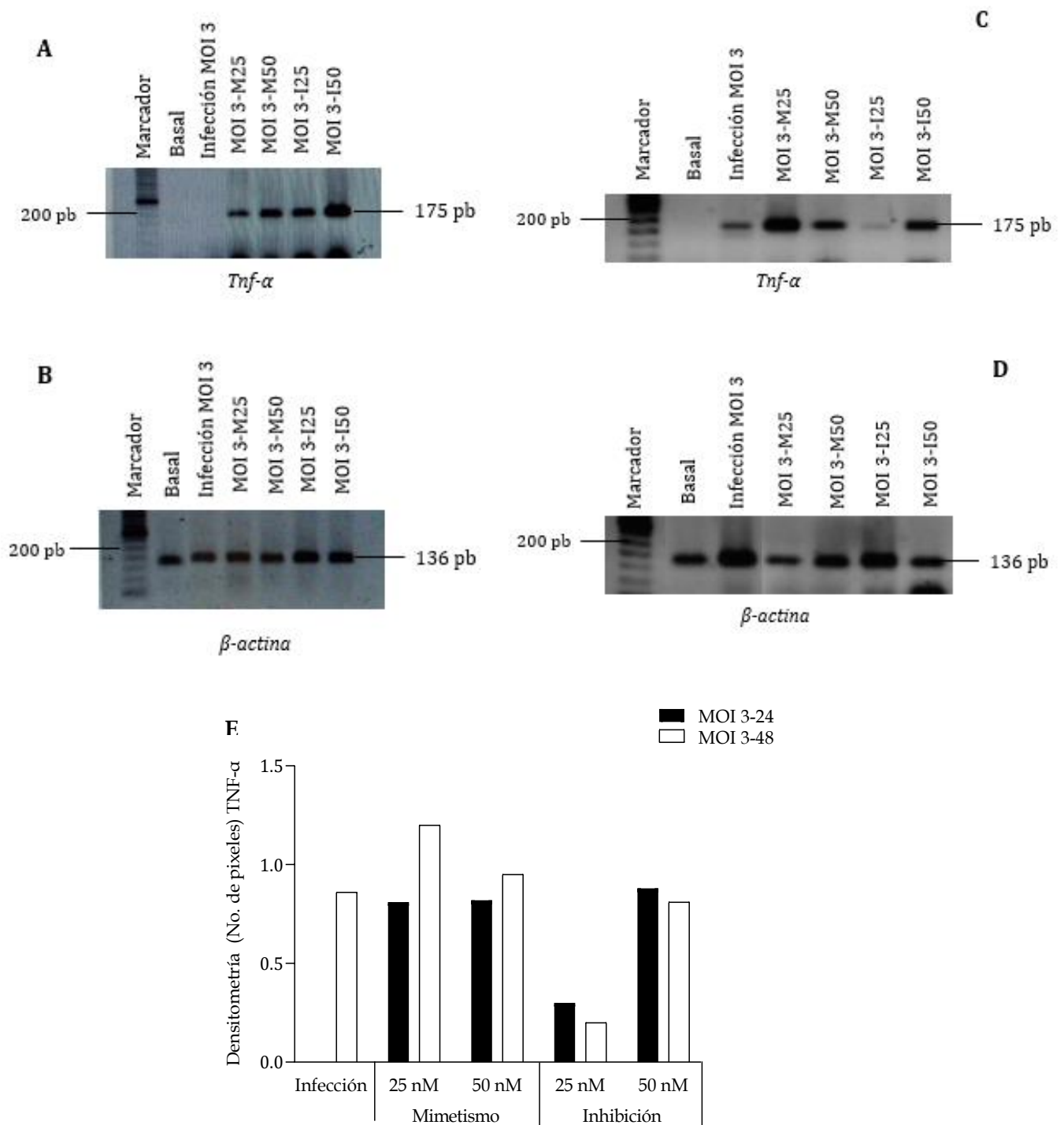


Fig. 15 Expresión de *tnf- α* en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* MOI 3. Macrófagos murinos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 3) y transfectados con mimetizador e inhibidor del miR-200a (25 y 50 nM) durante 24 y 48 horas. Se observa el producto de PCR punto final, verificado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%. **A.** *Tnf- α* , MOI 3- 24 horas **B.** β -actina, MOI 3- 24 horas **C.** *Tnf- α* , MOI 3- 48 horas **D.** β -actina, MOI 3- 48 horas **E.** Densitometría, los datos se expresan como número de píxeles.

8.6 Análisis de la expresión de genes blanco del miR-200a

Al evaluar la expresión de los genes blancos seleccionados (*tlr4* y *nfkbia*) en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* (MOI 1) se observó que a las 24 horas, la sobreexpresión del miR-200a, con 50 nM del mimetizador, resultó en una mayor expresión de estos genes, en comparación con la concentración 25 nM (Fig. 16A, B y E). En cambio, la inhibición del miR-200a (50 nM del inhibidor específico) resultó en una menor expresión tanto de *tlr4* como de *nfkbia* (Fig. 16C, D y E).

Los resultados del análisis de la expresión de los genes blancos *tlr4* y *nfkbia* en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* utilizando la MOI3 y 25 nM del mimetizador no fueron interpretables (Fig. 17 A y E). Sin embargo, la utilización de 50 nM del mimetizador sugirió que a las 24 horas ocurría un incremento en la expresión de *nfkbia* (Fig. 17B y E). Por otro parte la inhibición del miR-200a (25 nM de inhibidor) en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (MOI 3), provocó una menor expresión de *tlr4*, que al utilizar 50 nM del inhibidor (Fig. 17C y E), mientras que la expresión de *nfkbia* no se modificó (Fig. 17D y E).

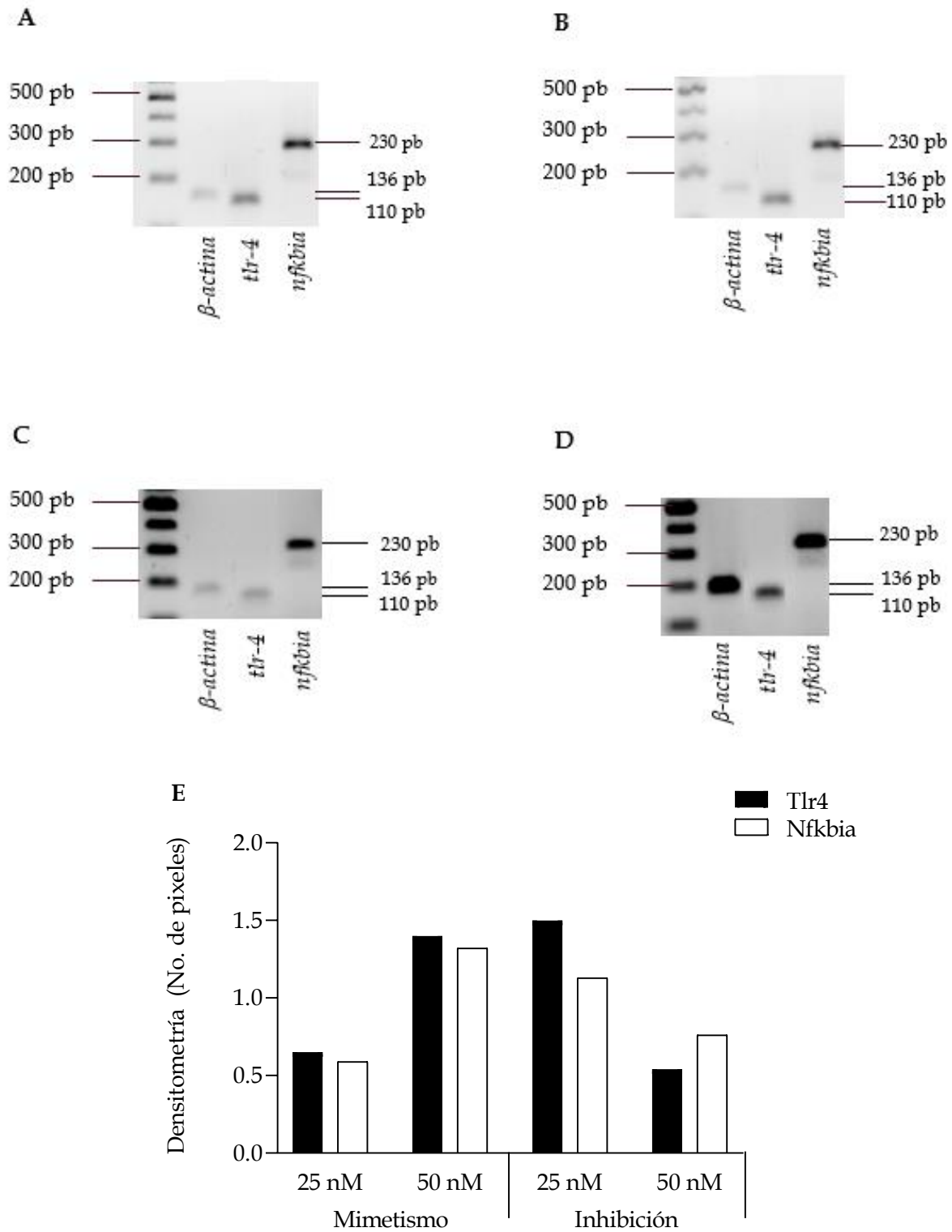


Fig. 16 Expresión de *tlr4* y *nfkb* en macrófagos J774. Macrófagos murinos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1) y transfectados con mimetizador e inhibidor del miR-200a (25 y 50 nM) durante 24 horas. Se observa el producto de PCR punto final, verificado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%. **A.** MOI 1-M25 nM **B.** MOI 1-M50 nM **C.** MOI 1- I25 nM **D.** MOI 1- I50 nM **E.** Densitometría, los datos se expresan como número de píxeles.

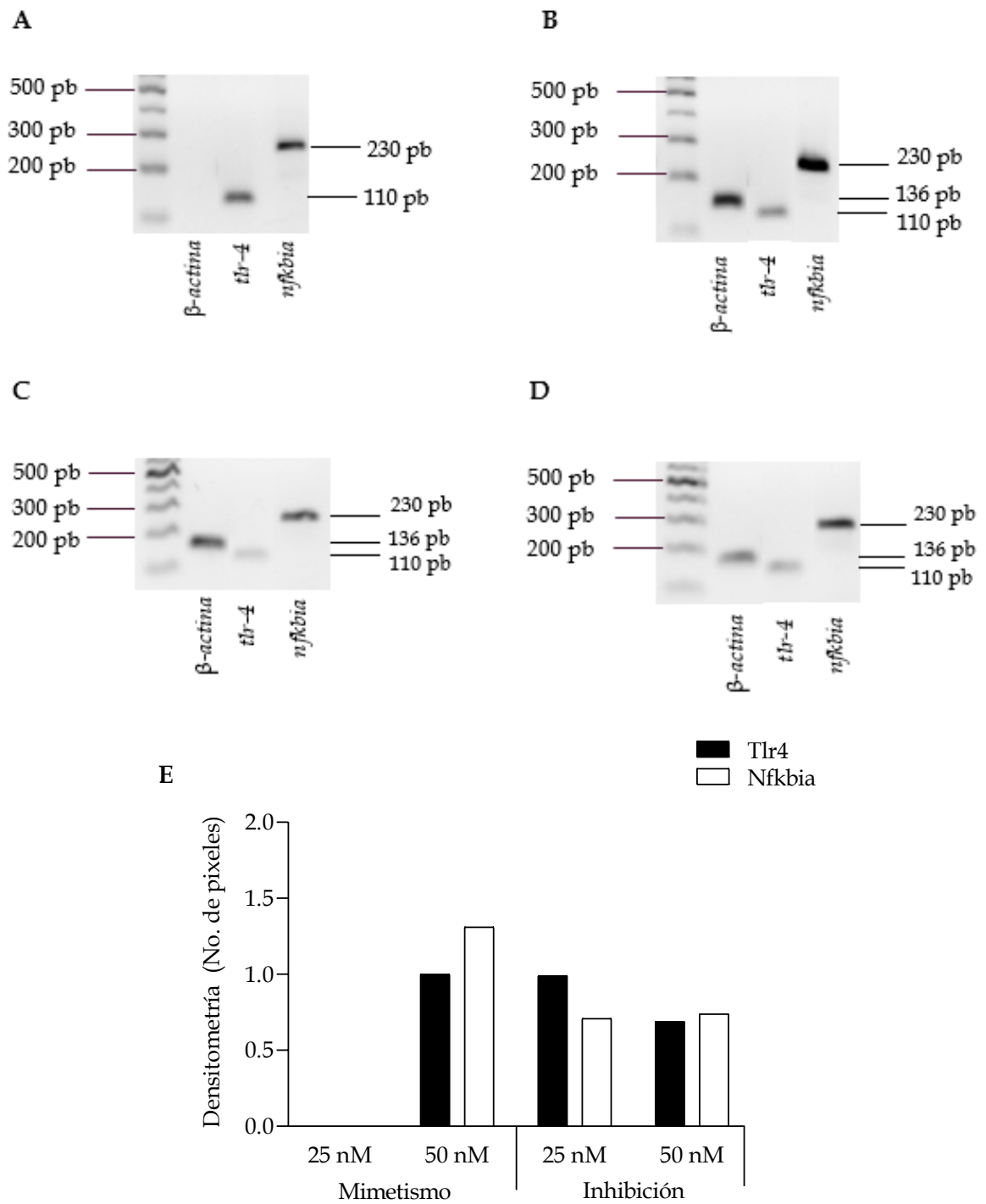


Fig. 17 Expresión de *tlr4* y *nfkb1a* en macrófagos J774. Macrófagos murinos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 3) y transfectados con mimetizador e inhibidor del miR-200a (25 y 50 nM) durante 24 horas. Se observa el producto de PCR punto final, verificado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%. **A.** MOI 3- M25 nM **B.** MOI 3- M50 nM **C.** MOI 3- I25 nM **D.** MOI 3- I50 nM **E.** Densitometría, los datos se expresan como número de pixeles.

9. DISCUSIÓN.

La tuberculosis es una de las enfermedades más letales del mundo; aproximadamente una cuarta parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*, agente causal de esta patología (Pai et al., 2016). La respuesta inmune innata tiene un papel muy importante en la infección por *M. tuberculosis*; ya que provee la primera línea de defensa del hospedero contra este patógeno. Dentro de las células inmunes encontramos a los macrófagos; quienes reconocen, fagocitan y eliminan a la micobacteria, sin embargo, *M. tuberculosis* tiene la capacidad de evadir los mecanismos bactericidas y persistir dentro de los macrófagos (Wellin et al., 2011; Philips J & Ernest J, 2012).

La respuesta inmune innata es un mecanismo regulado por diversos factores, entre ellos encontramos a los microRNAs; estos son RNAs pequeños no codificantes, que participan en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (O'Connell et al., 2010). Se ha visto que la desregulación de su expresión puede resultar en el desarrollo de alguna patología, en desordenes de la respuesta inmune o en el establecimiento de una infección crónica, como la tuberculosis (Kim et al. 2017). Durante los últimos años, diversas investigaciones se han dedicado a estudiar el papel de los miRNAs durante la infección por *M. tuberculosis*. (Bettencourt et al., 2016; Yang et al., 2018).

Un estudio reciente mostró que en el lavado bronquiolo alveolar de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* 5186, el miR-200a está sobreexpresado tras 3, 7 y 14 días p.i. (datos sin publicar). Por lo que, el presente trabajo estudio el papel del miR-200a en el control de la infección por *M. tuberculosis* H37Rv en macrófagos murinos J774. En los últimos años han sido usados diversos modelos experimentales en macrófagos para el estudio de la infección por *M. tuberculosis*, por ejemplo: macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM), macrófagos derivados de médula ósea (BMDM), diversas líneas celulares de macrófagos humanos, como

THP-1 y U937; de macrófagos murinos, como los, RAW264.7 y los J774 (Johnson & Abramovitch, 2015). Se conoce bien que los miembros de la familia miR-200 están involucrados en la regulación de la Transición Epitelio-Mesénquima, proceso celular que ha sido ampliamente estudiado en patologías como cáncer; además, la familia miR-200 regula procesos celulares como: adhesión celular tumoral, migración, invasión, metástasis, entre otros (Lim *et al.*, 2013; Humphries & Yang, 2015). Sin embargo, su participación durante procesos infecciosos, bacterianos o virales ha sido poco estudiada.

Según lo reportado por Wang y cols. (2016) en el bazo de *M. miiuy* (*miiuy croaker*), la expresión del miR-200a disminuye durante la infección causada por *V. anguillarum* y el estímulo de leucocitos de *M. miiuy* con LPS disminuye la expresión del miR-200a (Wang *et al.*, 2016). Del mismo modo, en celomocitos de *A. japonicus* infectados con *V. splendidus*, la expresión del miR-200 está disminuida, sin embargo, aumenta después del estímulo con LPS (Lv *et al.*, 2015). En nuestros resultados observamos que el miR-200a está sobreexpresado en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 10). Esto coincide con lo encontrado en el lavado bronquiolo alveolar de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (datos sin publicar). Además observamos que la expresión del miR-200a aumenta cuando la multiplicidad de infección es mayor (Fig. 9). Se ha visto que la inducción de Enteritis Necrótica (NE) en pollos White Leghorn, genera sobreexpresión del miR-200a (*gga-miR-200a-3p*) en células de la mucosa gástrica (Pham *et al.*, 2020). También se ha reportado que, en células de mucosa gástricas infectadas por *H. pylori*, la expresión del miR-200a es menor en comparación con células sanas (Stedel & Darfeuille, 2013). Por otro lado, en tejido pulmonar de ratones infectados con el Virus de Influenza r1918 la expresión de los miR-200a y miR-200b está disminuida (Li *et al.*, 2010). Asimismo, en muestras de tejido de Hepatocarcinoma (HCC) positivo al Virus de Hepatitis B, la expresión del miR-200a está disminuida comparada con tejido de HCC negativo a VHB, y se observa el mismo comportamiento en la línea celular HepG2.2.15 (línea celular positiva a VHB) (Shi *et al.*, 2017). De acuerdo con lo reportado en la literatura y lo encontrado en nuestro estudio, podemos afirmar que existen variaciones entre los

patrones de expresión del miR-200a durante procesos infecciosos, ya sean bacterianos o virales.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que puede sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedero, que son una de las células más importantes en la respuesta inmune innata, ya que producen péptidos antimicrobianos, hidrolasas ácidas, intermediarios reactivos de nitrógeno y especies reactivas de oxígeno (Behrouzi *et al.* 2019). Así mismo es conocido que los patógenos, como *M. tuberculosis*, pueden modular la expresión de diferentes miRNAs para atenuar la respuesta inmune del hospedero y asegurar su sobrevivencia (Bettencourt *et al.*, 2016). Nosotros observamos que la sobreexpresión del miR-200a con el mimetizador específico en macrófagos J774 infectados con *M. tuberculosis*, resultó en un incremento en el crecimiento intracelular del bacilo; mientras que, la inhibición de este microRNA no provocó disminución en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* (Fig. 12). Para verificar este efecto, se infectaron macrófagos derivados de monocitos (MDM) con *M. tuberculosis* a una multiplicidad de infección 1:3. La sobreexpresión del miR-200a con 25 nM del mimetizador no aumentó el crecimiento intracelular del bacilo, mientras que la inhibición del miR-200a (25 nM del inhibidor) mostró disminución en la sobrevivencia de *M. tuberculosis* en los macrófagos (Fig. sup. 1). Kumar y cols. (2012) mostraron que la infección con *M. tuberculosis* induce la expresión del miR-155 facilitando la sobrevivencia intracelular del patógeno, además observaron que la inhibición del miR-155 resulta en un decremento en la sobrevivencia del bacilo (Kumar *et al.*, 2012). Del mismo modo, la sobreexpresión del miR-30A y el miR-1958 en los macrófagos facilita la sobrevivencia de *M. tuberculosis* (Chen *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2019). Nuestros resultados sugirieron que la sobreexpresión del miR-200a durante la infección por *M. tuberculosis*, favorece la sobrevivencia intracelular del bacilo.

La respuesta inmune generada contra *M. tuberculosis* está principalmente determinada por las interacciones hospedero-patógeno y juega un papel crucial para la eliminación del patógeno (Philips & Ernst, 2012). Sin embargo, *M. tuberculosis* puede alterar la respuesta inmune del hospedero mediante la modulación de microRNAs

(Kim *et al.*, 2017). En macrófagos RAW264.7, durante la infección con *M. bovis* BCG, el miR-124 es capaz de modular la vía de señalización de TLR, ya que, múltiples componentes de la cascada de señalización de TLR, incluyendo TLR6, MyD88 y TRAF6, son blancos directos de este microRNA (Ma *et al.*, 2014). De igual forma, la infección por *M. bovis* BCG induce la expresión de los miR-203, miR-31 y miR-149, quienes tienen como blanco a MyD88; la desregulación de este gen conlleva a la supresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (Agarwal *et al.*, 2019). Nuestros resultados mostraron la sobreexpresión del miR-200a durante la infección de macrófagos murinos J774 con *M. tuberculosis* (Fig. 10), además de que la sobreexpresión de este miRNA produjo una mayor expresión del mRNA de *tnf- α* (Fig. 14, 15) citocina esencial para la respuesta inmune protectora en la tuberculosis, ya que participa en funciones celulares importantes, como la activación de macrófagos, la maduración de DC, apoptosis de macrófagos, quimiotaxis y formación del granuloma (Mootoo *et al.*, 2009). Un estudio reciente, mostró que la sobreexpresión del miR-let-7f aumenta la producción de TNF- α en macrófagos RAW264.7, lo que conlleva a una reducción en la sobrevivencia de *M. tuberculosis* (Kumar *et al.*, 2016). De igual forma, ratones deficientes de TNF- α son incapaces de controlar la infección por *M. tuberculosis* (Lin *et al.*, 2007). Igualmente, la sobreexpresión del miR-125b inhibe la producción de TNF- α durante la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares humanos (Rajaram *et al.*, 2011).

La producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , está asociada a la activación de NF- κ B por TLRs (Behrouzi *et al.*, 2019). Mediante un análisis *in silico*, mostramos que el miR-200a tiene como genes blancos a *myd88, tab1, tlr4, nfkb1a, nfkb1e, nfkb2, irak2, stat5a, pik3ca, pik3r1, bcl2a1d, tgfb1*; quienes están involucrados en la activación del Factor Nuclear κ B, señalización por TNF- α , señalización por TLRs, activación de PI3K/AKT, apoptosis, señalización por Rho GTPsas (Tabla 3). Estas vías de señalización celular son importantes para el reconocimiento del patógeno, la activación de la transcripción de genes que controlan la respuesta inmune y la eliminación de la micobacteria (Li & Verma, 2002). En los últimos años, diversas investigaciones han mostrado que durante la infección por *M. tuberculosis*, existe desregulación en la expresión de miRNAs que participan activamente en la regulación

de la activación de NF- κ B a través de TLRs (Yang *et al.*, 2018). Al evaluar la expresión de *tlr4* y *nfkbia* (genes blancos putativos del miR-200a) encontramos que en macrófagos murinos J774 infectados con *M. tuberculosis* la sobreexpresión del miR-200a aumentó la expresión de estos genes (Fig. 16), lo que sugiere que la sobreexpresión del miR-200a indujo la expresión de *tlr4* y *nfkbia*. También, determinamos que la inhibición del miR-200a genera menor expresión de *tlr4* y *nfkbia* (Fig. 16, 17). Se ha demostrado que la sobreexpresión del miR-200a (gga-miR-200a-3p) regula negativamente la expresión de TGF- β 2, ZAK (*Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK*) y MAP2K4 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4*), quienes están involucrados en la vía de señalización por MAP cinasas, dicha vía de señalización participa activamente en la respuesta inmune (Pham *et al.*, 2020). De igual forma, el miR-200a tiene como genes blancos confirmados a *stat2*, *stat4* (*Signal transducer and activator of transcripción 2/4*), *ifnr1* e *ifnr2* (*Interferon alpha and beta receptor subunit 1/2*) quienes participan en la vía de señalización de Interferón, la cual reprime la replicación viral (Li *et al.* 2010). Estudios anteriores han demostrado que otros miembros de la familia miR-200 tienen como genes blancos, a moléculas que participan en la vía de activación de NF- κ B a través de TLR durante procesos infecciosos. Niu y cols. (2017) demostraron que el miR-200b inhibe la inmunidad innata por la regulación negativa de MyD88 e IRAK4 durante la infección por VHB (Niu *et al.*, 2017). Del mismo modo, la sobreexpresión de los miR-200b y miR-200c decrecen la activación del Factor Nuclear kappa B, así como la expresión de MyD88, IL-6, TNF- α y CXCL9 (Wendlandt *et al.*, 2012).

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión del miR-200a favorece el crecimiento intracelular del bacilo y que además, genera aumento en la expresión de *tnf- α* ; sin embargo, también observamos que la inhibición del miRNA provoca disminución de la citocina (Fig. 16, 17). Esto podría deberse a que la vía de activación de NF- κ B a través de TLR está siendo regulada positiva y negativamente por el miR-200a, ya que este miRNA tiene como genes blancos putativos a *tlr4* y *nfkbia*. TLR4 participa en el reconocimiento del patógeno, en la activación de NF- κ B y la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Behrouzi *et al.*, 2019); mientras que NFKBIA (*Nuclear Factor κ -B Inhibitor alpha*) inhibe la activación de NF- κ B

(Li & Verma, 2002). A pesar de los resultados obtenidos, hacen falta más estudios para entender mejor el mecanismo por el cual el miR-200a participa en la regulación de la Respuesta Inmune durante la infección por *M. tuberculosis*.

10. CONCLUSIONES

- El miR-200a se sobreexpresa en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 1 y MOI 3) a las 24 y 48 horas. La expresión del miRNA fue mayor a las 48 horas con MOI 3 de infección (5.60 fold).
- La transfección del mimetizador (25 y 50 nM) incrementa el crecimiento intracelular del bacilo en macrófagos murinos.
- La inhibición del miR-200a no disminuye el crecimiento intracelular del bacilo en macrófagos murinos.
- La inhibición del miR-200a decrece el número de UFC en macrófagos derivados de monocitos humanos.
- El miR-200a tiene como blancos potenciales a: *dlc1*, *myd88*, *nfkbia*, *nfkbie*, *nfk2*, *irak2*, *tab1*, *stat5a*, *tlr4*, *bcl2a1d*, *tgfbr1*, *pik3ca* y *pik3r1*, quienes participan en procesos celulares importantes para la respuesta inmune.
- La inhibición del miR-200a (con 25 nM del inhibidor) en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (MOI 1, MOI 3), durante 48 horas, disminuye la expresión de *tnf- α* .

12. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados mostraron que durante la infección por *M. tuberculosis* la expresión del miR-200a aumenta, además que la sobreexpresión del miRNA favorece el crecimiento intracelular del bacilo y aumenta la expresión de *tnf-a*. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para dilucidar el papel que tiene este miRNA durante la infección por este patógeno. Primeramente, es necesario realizar la validación de *tlr-4* y *nfkbia* como genes blanco directos del miR-200a. Posterior a esto, se podría evaluar la participación del miR-200a en otros procesos celulares relacionados a la Respuesta Inmune, por ejemplo, su rol en la regulación de la apoptosis y autofagia durante el proceso infeccioso ó durante la maduración del fagosoma para la eliminación del bacilo. Estas investigaciones nos darán una visión más amplia y nos permitirán comprender mejor el papel que tiene el miR-200a durante la infección por *M. tuberculosis*.

11. REFERENCIAS.

1. Abdalla AE, Duan X, Deng W, Zeng J, Xie J. MicroRNAs play big roles in modulating macrophages response toward mycobacteria infection. *Infect Genet Evol* 2016; 45: 378-382.
2. Abd-El-Fattah, A. A., Sadik, N. A., Shaker, O. G., & Aboulftouh, M. L. (2013). Differential microRNAs expression in serum of patients with lung cancer, pulmonar tuberculosis and pneumonia. *Cell Biochem Biophys*. doi:10.1007/s12013-013-9575-y
3. Agarwal, R. G., Sharma, P., & Nyati, K. K. (2019). microRNAs in Mycobacterial Infection: Modulation of Host Immune Response and Apoptotic Pathways. *Immune network*, 19(5).
4. Andreu, N., Phelan, J., Paola, F., Cliff, J. M., Clark, T. G., & Hibberd, M. L. (2017). Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific reports*, 7, 42225.
5. Behrouzi, A., Alimohammadi, M., Nafari, A. H., Yousefi, M. H., Rad, F. R., Vaziri, F., & Siadat, S. D. (2019). The role of host miRNAs on *Mycobacterium tuberculosis*. *ExRNA*, 1(1), 1-10.
6. Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., ... & Rubinsztein, D. C. (2016). Mammalian autophagy: how does it work?. *Annual review of biochemistry*, 85, 685-713.
7. Bhat, K. H., & Yaseen, I. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*: Macrophage Takeover and Modulation of Innate Effector Responses. *Mycobacterium: Research and Development*, 11.
8. Ceppi, M., Pereira, P. M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M. A., & Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling

- pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(8), 2735-2740.
9. Chan, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., & Bloom, B. R. (1991). Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infection and immunity*, 59(5), 1755-1761.
 10. Chen, Y., Chen, J., Wang, H., Shi, J., Wu, K., Liu, S., ... & Wu, J. (2013). HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS pathogens*, 9(4).
 11. Cheng, K., Rai, P., Plagov, A., Lan, X., Mathieson, P. W., Saleem, M. A., ... & Singhal, P. C. (2013). Rapamycin-induced modulation of miRNA expression is associated with amelioration of HIV-associated nephropathy (HIVAN). *Experimental cell research*, 319(13), 2073-2080.
 12. Chen, Z., Wang, T., Liu, Z., Zhang, G., Wang, J., Feng, S., & Liang, J. (2015). Inhibition of autophagy by MiR-30A induced by mycobacteria tuberculosis as a possible mechanism of immune escape in human macrophages. *Japanese journal of infectious diseases*, 68(5), 420-424.
 13. Ciaramella A, Martino A, Cicconi R, Colizzi V & Fraziano M (2000). Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell Death Differ* 7(12): 1270-2.
 14. Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Current opinion in immunology*, 18(4), 375-382.
 15. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, Van Zyl-Smit RN & Zhang Y (2010). The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology* 15(3): 433-450

16. Ding, S., Qu, Y., Yang, S., Zhao, Y. E., & Xu, G. (2019). Novel miR-1958 Promotes Mycobacterium tuberculosis Survival in RAW264. 7 Cells by Inhibiting Autophagy Via Atg5. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(6), 989-998.
17. Dorronsoro I & Torroba L (2007) Microbiology of tuberculosis. *An Sist Sanit Navar* 30(Supl. 2); 67-84.
18. Dudda, J. C., Salaun, B., Ji, Y., Palmer, D. C., Monnot, G. C., Merck, E., ... & Muljo, S. A. (2013). MicroRNA-155 is required for effector CD8⁺ T cell responses to virus infection and cancer. *Immunity*, 38(4), 742-753.
19. Ellis-Connell, A. L., Iempridee, T., Xu, I., & Mertz, J. E. (2010). Cellular microRNAs 200b and 429 regulate the Epstein-Barr virus switch between latency and lytic replication. *Journal of virology*, 84(19), 10329-10343.
20. Ernst, J. D. (1998). Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity*, 66(4), 1277-1281.
21. Ernst, J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 581-591.
22. Escobar, T. M., Kanellopoulou, C., Kugler, D. G., Kilaru, G., Nguyen, C. K., Nagarajan, V., ... & Liu, X. (2014). miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA-binding protein Jarid2 to relieve polycomb-mediated repression. *Immunity*, 40(6), 865-879.
23. Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C., & Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis. *Cell*, 123(5), 819-831.
24. Feng, X., Wang, Z., Fillmore, R., & Xi, Y. (2014). MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer letters*, 344(2), 166-173.

25. Flannagan, R. S., Cosío, G., & Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 355-366.
26. Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 93-129.
27. Fontana, L., Pelosi, E., Greco, P., Racanicchi, S., Testa, U., Liuzzi, F., ... & Peschle, C. (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nature Cell Biology*, 9(7), 775-787.
28. Fu, X., Zeng, L., Liu, Z., Ke, X., Lei, L., & Li, G. (2016). MicroRNA-206 regulates the secretion of inflammatory cytokines and MMP9 expression by targeting TIMP3 in Mycobacterium tuberculosis-infected THP-1 human macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 477(2), 167-173.
29. González-Martin, J. (2014). Microbiología de la tuberculosis. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 15(1), 25-33.
30. Gregory, R. I., & Shiekhattar, R. (2005). MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Research*, 65(9), 3509-3512.
31. Harapan, H., Fitra, F., Ichsan, I., Mulyadi, M., Miotto, P., Hasan, N. A., ... & Cirillo, D. M. (2013). The roles of microRNAs on tuberculosis infection: meaning or myth?. *Tuberculosis*, 93(6), 596-605.
32. Holla, S., Kurowska-Stolarska, M., Bayry, J., & Balaji, K. N. (2014). Selective inhibition of IFNG-induced autophagy by Mir155-and Mir31-responsive WNT5A and SHH signaling. *Autophagy*, 10(2), 311-330.
33. Hoffmann, J., Machado, D., Terrier, O., Pouzol, S., Messaoudi, M., Basualdo, W., ... & Bénet, T. (2016). Viral and bacterial co-infection in severe pneumonia triggers innate immune responses and specifically enhances IP-10: a translational study. *Scientific reports*, 6, 38532.

34. Hu, B. L., Shi, C., Lei, R. E., Lu, D. H., Luo, W., Qin, S. Y., ... & Jiang, H. X. (2016). Interleukin-22 ameliorates liver fibrosis through miR-200a/beta-catenin. *Scientific reports*, 6, 36436.
35. Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., & Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry*, 67(1), 129-139.
36. Huffaker, T. B., Hu, R., Runtsch, M. C., Bake, E., Chen, X., Zhao, J., ... & O'Connell, R. M. (2012). Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. *Cell reports*, 2(6), 1697-1709.
37. Humphries, B., & Yang, C. (2015). The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*, 6(9), 6472.
38. Johnson, B. K., & Abramovitch, R. B. (2015). Macrophage infection models for *Mycobacterium tuberculosis*. In *Mycobacteria Protocols* (pp. 329-341). Humana Press, New York, NY.
39. Kim, J. K., Kim, T. S., Basu, J., & Jo, E. K. (2017). MicroRNA in innate immunity and autophagy during mycobacterial infection. *Cellular microbiology*, 19(1), e12687.
40. Kim, J. K., Lee, H. M., Park, K. S., Shin, D. M., Kim, T. S., Kim, Y. S., ... & Son, J. W. (2017). MIR144* inhibits antimicrobial responses against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2. *Autophagy*, 13(2), 423-441.
41. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A., Netea, M. G., & Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.
42. Knouf, E. C., Garg, K., Arroyo, J. D., Correa, Y., Sarkar, D., Parkin, R. K., ... & Ruzzo, W. L. (2012). An integrative genomic approach identifies p73 and p63 as

- activators of miR-200 microRNA family transcription. *Nucleic acids research*, 40(2), 499-510.
43. Kumar, R., Halder, P., Sahu, S. K., Kumar, M., Kumari, M., Jana, K., ... & Basu, J. (2012). Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular microbiology*, 14(10), 1620-1631.
44. Kumar, M., Sahu, S. K., Kumar, R., Subuddhi, A., Maji, R. K., Jana, K., ... & van Loo, G. (2015). MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF- κ B pathway. *Cell Host & Microbe*, 17(3), 345-356.
45. Landsman, L., Varol, C., & Jung, S. (2007). Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *The Journal of Immunology*, 178(4), 2000-2007.
46. Li, Q., & Verma, I. M. (2002). NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 725-734.
47. Li, Y., Chan, E. Y., Li, J., Ni, C., Peng, X., Rosenzweig, E., Tumpey, T. M., & Katze, M. G. (2010). MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *Journal of virology*, 84(6), 3023-3032. <https://doi.org/10.1128/JVI.02203-09>
48. Li, S., Yue, Y., Xu, W., & Xiong, S. (2013). MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PloS one*, 8(12).
49. Li, H., Wang, Y., & Song, Y. (2018). MicroRNA-26b inhibits the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) infection in THP-1 cells via targeting TGF β -activated kinase-1 (TAK1), a promoter of the NF- κ B pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(3), 1218.
50. Li, W. T., & Zhang, Q. (2019). MicroRNA-708-5p regulates mycobacterial vitality and the secretion of inflammatory factors in *Mycobacterium tuberculosis*-

- infected macrophages by targeting TLR4. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(18), 8028-8038.
51. Lim, Y. Y., Wright, J. A., Attema, J. L., Gregory, P. A., Bert, A. G., Smith, E., ... & Goodall, G. J. (2013). Epigenetic modulation of the miR-200 family is associated with transition to a breast cancer stem-cell-like state. *J Cell Sci*, 126(10), 2256-2266.
 52. Lin, P. L., Plessner, H. L., Voitenok, N. N., & Flynn, J. L. (2007). Tumor necrosis factor and tuberculosis. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings*, 12(1), 22-25. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsymp.5650027>
 53. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 321-333.
 54. Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(12), 963-975.
 55. Liu, Q., Du, J., Yu, X., Xu, J., Huang, F., Li, X., ... & Zhao, Y. (2017). miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell discovery*, 3(1), 1-17.
 56. Liu, F., Chen, J., Wang, P., Li, H., Zhou, Y., Liu, H., ... & Cui, Z. (2018). MicroRNA-27a controls the intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* by regulating calcium-associated autophagy. *Nature communications*, 9(1), 1-14.
 57. Lu, Y., Wang, X., Dong, H., Wang, X., Yang, P., Han, L., ... & Zhang, L. (2019). Bioinformatics analysis of microRNA expression between patients with and without latent tuberculosis infections. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(5), 3977-3988.
 58. Lv, Z., Li, C., Zhang, P., Wang, Z., Zhang, W., & Jin, C. H. (2015). miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus*. *Fish & shellfish immunology*, 45(2), 431-436.

59. Ma, C., Li, Y., Li, M., Deng, G., Wu, X., Zeng, J., ... & Liu, X. (2014). microRNA-124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection. *Molecular immunology*, 62(1), 150-158.
60. Maulén, N. P. (2011). Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile*, 139, 1605-1610.
61. McLaughlin, B., Chon, J. S., MacGurn, J. A., Carlsson, F., Cheng, T. L., Cox, J. S., & Brown, E. J. (2007). A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS pathogens*, 3(8).
62. Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349.
63. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55:663-700.
64. Meng, Q. L., Liu, F., Yang, X. Y., Liu, X. M., Zhang, X., Zhang, C., & Zhang, Z. D. (2014). Identification of latent tuberculosis infection-related microRNAs in human U937 macrophages expressing *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16. 3. *BMC microbiology*, 14(1), 37.
65. Mizuguchi, Y., Specht, S., Lunz III, J. G., Isse, K., Corbitt, N., Takizawa, T., & Demetris, A. J. (2012). Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics. *PloS one*, 7(2).
66. Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M. A., & Reljic, R. (2009). TNF- α in Tuberculosis: A Cytokine with a Split Personality. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 8(1), 53-62.
67. Mortaz, E., Varahram, M., Farnia, P., Bahadori, M., & Masjedi, M. R. (2012). New aspects in immunopathology of *Mycobacterium tuberculosis*. *ISRN Immunology*. doi:10.5402/2012/963879.

68. Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723-737.
69. Ni, B., Rajaram, M. V., Lafuse, W. P., Landes, M. B., & Schlesinger, L. S. (2014). Mycobacterium tuberculosis decreases human macrophage IFN- γ responsiveness through miR-132 and miR-26a. *The Journal of Immunology*, 193(9), 4537-4547.
70. Niu, Y., Gao, M., Feng, N., & Yang, J. (2017). miR-200b suppresses host innate immune response against HBV infection by targeting TLR4 signaling pathway.
71. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
72. O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1604-1609.
73. O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 111-122.
74. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019) Informe Mundial sobre la Tuberculosis.
75. Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2018) Tuberculosis en las Américas 2018, Washington D. C., OPS/CDE/18-036.
76. Ouimet, M., Koster, S., Sakowski, E., Ramkhelawon, B., Van Solingen, C., Oldebeken, S., ... & Cecchini, K. (2016). Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. *Nature immunology*, 17(6), 677.
77. Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., . . . Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1-23.

78. Pham, T. T., Ban, J., Hong, Y., Lee, J., Vu, T. H., Truong, A. D., ... & Hong, Y. H. (2020). MicroRNA gga-miR-200a-3p modulates immune response via MAPK signaling pathway in chicken afflicted with necrotic enteritis. *Veterinary research*, 51(1), 1-11.
79. Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 353-384.
80. Qi, Y., Cui, L., Ge, Y., Shi, Z., Zhao, K., Guo, X., ... & Zhou, M. (2012). Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection. *BMC infectious diseases*, 12(1), 384.
81. Qin, Y., Wang, Q., Zhou, Y., Duan, Y., & Gao, Q. (2016). Inhibition of IFN- γ -induced nitric oxide dependent antimycobacterial activity by miR-155 and C/EBP β . *International journal of molecular sciences*, 17(4), 535.
82. Rajaram, M. V., Ni, B., Morris, J. D., Brooks, M. N., Carlson, T. K., Bakthavachalu, B., ... & Schlesinger, L. S. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(42), 17408-17413.
83. Robinson, J. M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(4), 465-469.
84. Rothchild, A. C., Sissons, J. R., Shafiani, S., Plaisier, C., Min, D., Mai, D., ... & Baliga, N. S. (2016). MiR-155-regulated molecular network orchestrates cell fate in the innate and adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41), E6172-E6181.
85. Roy, S. S., Gonugunta, V. K., Bandyopadhyay, A., Rao, M. K., Goodall, G. J., Sun, L., ... & Vadlamudi, R. K. (2014). Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer. *Oncogene*, 33(28), 3707-3716.

86. Russell, D. G. (2001). Mycobacterium tuberculosis; here today and here tomorrow. *Nature Reviews*, 2, 1-9.
87. Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 39-47.
88. Saba, R., Sorensen, D. L., & Booth, S. A. (2014). MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. *Frontiers in immunology*, 5, 578.
89. Satyanarayanan, S. K., Shih, Y. H., Wen, Y. R., Palani, M., Lin, Y. W., Su, H., ... & Su, K. P. (2019). miR-200a-3p modulates gene expression in comorbid pain and depression: molecular implication for central sensitization. *Brain, behavior, and immunity*, 82, 230-238.
90. Saunders, B. M., Orme, I. M., & Basaraba, R. J. (2008). Immunopathology of tuberculosis. *Handbook of tuberculosis*, 245-278.
91. Schorey, J. S., & Schlesinger, L. S. (2016). Innate immune responses to tuberculosis. *Microbiol Spectr* 4, 3–31. doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0010-2016.
92. Secretaria de Salud (SSA) (2019) Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las micobacteriosis (tuberculosis y lepra), México.
93. Schluger, N. W. (2005). The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(4), 251-256.
94. Sharbati, J., Lewin, A., Kutz-Lohroff, B., Kamal, E., Einspanier, R., & Sharbati, S. (2011). Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection. *PLoS one*, 6(5), e20258.

95. Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., Hennessey, E. J., Martin, C., O'leary, J. J., Ruan, Q., ... & O'Neill, L. A. (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature immunology*, 11(2), 141.
96. Shi, T., Hua, Q., Ma, Z., & Lv, Q. (2017). Downregulation of miR-200a-3p induced by hepatitis B Virus X (HBx) Protein promotes cell proliferation and invasion in HBV-infection-associated hepatocarcinoma. *Pathology-Research and Practice*, 213(12), 1464-1469.
97. Singh, Y., Kaul, V., Mehra, A., Chatterjee, S., Tousif, S., Dwivedi, V. P., ... & Das, G. (2013). Mycobacterium tuberculosis controls microRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 5056-5061.
98. Staedel, C., & Darfeuille, F. (2013). MicroRNAs and bacterial infection. *Cellular microbiology*, 15(9), 1496-1507. <https://doi.org/10.1111/cmi.12159>
99. Steenken Jr, W., Oatway Jr, W. H., & Petroff, S. A. (1934). Biological studies of the tubercle bacillus: III. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H37). *The Journal of Experimental Medicine*, 60(4), 515.
100. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12481-12486.
101. Tellez, C. S., Juri, D. E., Do, K., Bernauer, A. M., Thomas, C. L., Damiani, L. A., ... & Belinsky, S. A. (2011). EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer research*, 71(8), 3087-3097.

102. Tu, H., Yang, S., Jiang, T., Wei, L., Shi, L., Liu, C., ... & Chen, J. (2019). Elevated pulmonary tuberculosis biomarker miR-423-5p plays critical role in the occurrence of active TB by inhibiting autophagosome-lysosome fusion. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 448-460.
103. Wang, C., Yang, S., Sun, G., Tang, X., Lu, S., Neyrolles, O., & Gao, Q. (2011). Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PloS one*, 6(10).
104. Wang, B., Koh, P., Winbanks, C., Coughlan, M. T., McClelland, A., Watson, A., ... & Kantharidis, P. (2011). miR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- β 2 expression. *diabetes*, 60(1), 280-287.
105. Wang, J., Yang, K., Zhou, L., Wu, Y., Zhu, M., Lai, X., ... & Zhong, Q. (2013). MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. *PLoS pathog*, 9(10), e1003697.
106. Wang, Y., Xu, G., Han, J., & Xu, T. (2016). miR-200a-3p regulates TLR1 expression in bacterial challenged miiuy croaker. *Developmental & Comparative Immunology*, 63, 181-186.
107. Watson, R. O., Manzanillo, P. S., & Cox, J. S. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, 150(4), 803-815.
108. Weiss, G., & Schaible, U. E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological reviews*, 264(1), 182-203.
109. Welin, A. (2011). Survival strategies of Mycobacterium tuberculosis inside the human macrophage (*Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press*).
110. Wendlandt, E. B., Graff, J. W., Gioannini, T. L., McCaffrey, A. P., & Wilson, M. E. (2012). The role of microRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF- κ B activation. *Innate Immunity*, 18(6), 846-855.

111. Wu, Z., Lu, H., Sheng, J., & Li, L. (2012). Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. *FEBS letters*, 586(16), 2459-2467.
112. Wu, L. S. H., Lee, S. W., Huang, K. Y., Lee, T. Y., Hsu, P. W. C., & Weng, J. T. Y. (2014). Systematic expression profiling analysis identifies specific microRNA-gene interactions that may differentiate between active and latent tuberculosis infection. *BioMed research international*, 2014.
113. Wu, Y., Sun, Q., & Dai, L. (2017). Immune regulation of miR-30 on the Mycobacterium tuberculosis-induced TLR/MyD88 signaling pathway in THP-1 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(4), 3299-3303.
114. Yang, T., & Ge, B. (2018). miRNAs in immune responses to Mycobacterium tuberculosis infection. *Cancer letters*, 431, 22-30.
115. Yeruva, L., Pouncey, D. L., Eledge, M. R., Bhattacharya, S., Luo, C., Weatherford, E. W., ... & Rank, R. G. (2017). MicroRNAs modulate pathogenesis resulting from chlamydial infection in mice. *Infection and immunity*, 85(1).
116. Yi, Z., Fu, Y., Ji, R., Li, R., & Guan, Z. (2012). Altered microRNA signatures in sputum of patients with active pulmonary tuberculosis. *PloS one*, 7(8).
117. Yu, Y., Wu, J., Guan, L., Qi, L., Tang, Y., Ma, B., ... & Zhang, H. (2013). Kindlin 2 promotes breast cancer invasion via epigenetic silencing of the microRNA200 gene family. *International journal of cancer*, 133(6), 1368-1379.
118. Zhang, X., Guo, J., Fan, S., Li, Y., Wei, L., Yang, X., ... & Ping, Z. (2013). Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis. *PloS one*, 8(12).
119. Zhang, L., Yang, F. U., Yuan, J. H., Yuan, S. X., Zhou, W. P., Huo, X. S., ... & Sun, S. H. (2013). Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 34(3), 577-586.

120. Zhao, Y., Yu, X., Tang, H., Han, R., Wang, X., Wang, J., ... & Li, G. (2020). MicroRNA-200a Promotes Phagocytosis of Macrophages and Suppresses Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Nasopharyngeal Carcinoma by Targeting CD47. *BioMed Research International*, 2020.
121. Zheng, L., Leung, E., Lee, N., Lui, G., To, K. F., Chan, R. C., & Ip, M. (2015). Differential microRNA expression in human macrophages with Mycobacterium tuberculosis infection of Beijing/W and non-Beijing/W strain types. *PLoS One*, 10(6).

12. ANEXOS

ANEXO 1.

Tabla Suplementaria 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes blancos putativos del miR-200a.

<i>Gen</i>		Primer	Tm
<i>Dlc1</i>	F	5'- GGA-TCG-ACT-CTT-GAC-TGG-AA-3'	53° C
	R	5'-TTT-AAG -ATT-ATG-CCA-CAC-GGC-3'	
<i>Tlr4</i>	F	5'- ACA-AAA-CTC-TGG-GGC-CTA A-3'	55° C
	R	5'- ATA-GCT-TAG-CAG-CCA-TGT-GT-3'	
<i>Nfkbia</i>	F	5'- TTT-ACT-GGG-GTG-ATT-CGG-CT-3'	60° C
	R	5'- CAC-CTG-GCT-CTT-ACA-TGG-GA-3'	
<i>MyD88</i>	F	5'- GCG-GTT-CAT-CAC TAT ATG CG-3'	-----
	R	5'-CTC-CGC-ATC-AGT-CTC-ATC-TT-3'	
<i>Irak2</i>	F	5'- CCT-GTG-TCA-CCT-GGA-ACT-CT-3'	-----
	R	5'- ACG-ACA-TCT-GCT-TCA-CTC-CA-3'	
<i>IL-6</i>	F	5'- CTG-GGG-ATG-TCT-GTA-GCT-CA-3'	-----
	R	5'- CTG-TGA-AGT-CTC-CTC-TCC-GG-3'	
<i>Pik3r1</i>	F	5'-CAC-CCA-AGC-CAC-TAC-TGT-A-3'	-----
	R	5'-GAG-TGT-AAT-CGC-CGT-GCA-TT-3'	
<i>Tab1</i>	F	5'-CTC-TAC-GTT-GCC-AAT-GTC-GG-3'	-----
	R	5'-AGC-AGG-TCA-ATG-TCG-GTG-TA-3'	

ANEXO 2.

Tabla suplementaria 2. Genes blanco putativos del miR-200a. Se muestra el listado de genes blancos putativos del miR-200a comunes entre las bases de datos consultadas y los genes desregulados durante la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos J774 reportados por Andreu y cols. (2017). Las marcas (x) muestran la presencia del gen en las herramientas consultadas.

<i>Gen</i>	TargetScan	microRNA	miRDB	Pictar	Genes desregulados
<i>Zeb1</i>	x	x	x	x	
<i>Zeb2</i>	x	x	x	x	
<i>Nrp1</i>	x	x	x		x
<i>Nfkbia</i>	x	x	x	x	x
<i>Dlx5</i>		x	x		x
<i>Aco1</i>		x	x		x
<i>Gab1</i>		x	x	x	
<i>Abl2</i>	x	x			x
<i>Tlr4</i>	x	x	x	x	x
<i>Dlc1</i>	x	x	x	x	x
<i>Tgfb2</i>	x	x	x		x
<i>Qk</i>		x	x		
<i>Hif1a</i>	x	x	x		x
<i>Il1r2</i>		x	x		x
<i>Stat5a</i>	x	x	x	x	x
<i>Nfkbie</i>	x	x	x	x	x
<i>Nfkb2</i>	x	x	x	x	x
<i>Pi3kr1</i>	x	x	x	x	x
<i>Pi3kca</i>	x	x	x	x	x
<i>Bcl2a1d</i>	x	x	x	x	x
<i>MyD88</i>	x	x	x	x	x
<i>Irak2</i>	x	x	x	x	x
<i>Tab1</i>	x	x	x	x	x
<i>Tgfb1</i>	x	x	x	x	x
<i>Pik3cg</i>		x	x		
<i>Irak1bp1</i>	x	x			
<i>Pik3c2b</i>	x		x		
<i>Dclk1</i>		x	x		
<i>Map2k4</i>		x	x		x

<i>Gen</i>	TargetScan	microRNA	miRDB	Pictar	Genes desregulados
<i>Pik3r5</i>	x	x			x
<i>C3ar1</i>		x	x		x
<i>Atg7</i>		x	x		
<i>Rab5a</i>	x	x	x		x
<i>Efr3b</i>	x	x			x
<i>Nfkbiz</i>	x	x			x
<i>Bcl2l11</i>	x		x		x
<i>Nfkbib</i>	x	x			x
<i>Pik3ap1</i>	x		x		x
<i>Pik3r5</i>	x	x			x
<i>Pik3r6</i>	x	x			x
<i>Abcc5</i>	x		x		x
<i>Pik3r3</i>	x	x			x
<i>Irak1</i>	x	x	x		x
<i>Tgfbr3</i>	x	x			x
<i>Pten</i>	x	x			
<i>Atg13</i>		x	x		
<i>Il10ra</i>	x	x			x
<i>Bcl2</i>		x	x		
<i>Il1b</i>	x		x		x
<i>Acap1</i>	x		x		x
<i>Pik3cg</i>		x	x		x
<i>Wnt6</i>	x	x	x		x
<i>Akt3</i>	x	x			x
<i>Wnt1</i>		x	x		
<i>Mapk6</i>	x		x		x
<i>Hif1an</i>	x	x			
<i>Ifnar1</i>	x	x			
<i>Nfkb1</i>	x	x			x
<i>Stat5b</i>	x		x		x

ANEXO 3.

Efecto del mimetismo y la inhibición del miR-200a en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv en macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM).

Para obtener MDM se realizó la purificación de monocitos a partir de *buffy coats* de donadores sanos, los cuales, fueron proporcionados por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSTE. En tubos estériles de 50 ml, se colocaron 30 ml de sangre sobre 15 ml de Histopaque-1077 (densidad 1.077 g/ml, Sigma Aldrich), se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos y se recuperó la interfase, en la que se encuentran las células mononucleadas. La interface celular se transfirió a en un tubo estéril de 15 ml y se lavó por inversión con medio RPMI-1640 sin suero, se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio fresco. El procedimiento se repitió tres veces. Las células mononucleares se colocaron en cajas de petri para cultivo celular (100 mm) y se incubaron por 2 horas a 37°C, 5% CO₂, 90% humedad. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron las células en suspensión y la monocapa celular se lavó tres veces con medio RPMI-1640, para eliminar todas las células que no estuvieran adheridas a la superficie de la caja. El cultivo se mantuvo en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 10 días, para permitir su diferenciación a macrófagos. El protocolo fue aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Manuel Cosío Villegas”.

Después de 10 días, el cultivo se retiró de la incubadora, se verificó al microscopio el cambio de morfología de los monocitos y se procedió a cosechar las células. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se realizaron tres lavados con medio RPMI-1640; se colocó 1 ml de tripsina 0.05% y se incubó durante 2 minutos; transcurrido el tiempo, se verificó al microscopio que las células estuvieran en suspensión, siendo así, se añadieron 2 ml de RPMI-SFB para neutralizar la acción de la tripsina. Las células se cosecharon y se colocaron en un tubo estéril de 15 ml con 10 ml

de medio RPMI-1640, se lavaron por inversión y centrifugaron a 1,200 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en RPMI-SFB. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron 120,000 células por pozo en una placa de 24 pozos. Los MDM se infectaron a una MOI de 3, para ello, se tomaron 30 μ l de la suspensión de micobacterias y se colocaron en un tubo estéril de 2 ml con 1,220 μ l de medio RPMI-1640, homogenizando por pipeteo. Se tomaron 50 μ l de la bacteriana y se goteó en el pozo correspondiente, esto se realizó en el número de pozos seleccionados para el experimento, además se realizó la transfección (sección 7.4) del mimetizador (25 nM) e inhibidor (25 nM) específicos del miR-200a, hasta por 72 horas. La placa se mantuvo en incubación a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad, hasta su uso posterior.

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión del miR-200a con 25 nM del mimetizador no aumentó el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*; en cambio, la inhibición del miRNA (25 nM del inhibidor) provocó menor crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos derivados de monocitos humanos (Fig. Sup. 1).

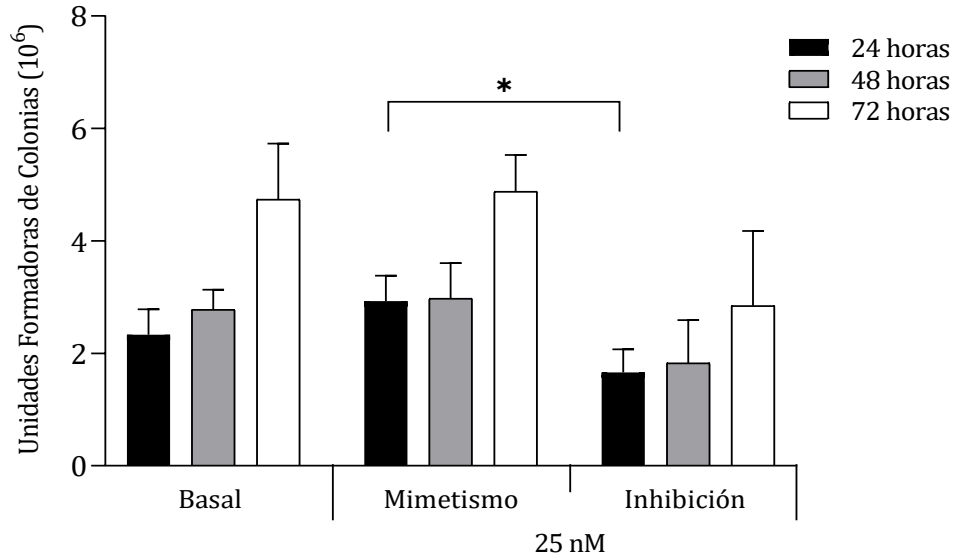


Fig. Suplementaria 1. Crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en MDM. Macrófagos derivados de monocitos humanos fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv a una multiplicidad de infección de 3 y transfectados con 25 nM de mimetizador e inhibidor del miR-200a, durante 24, 48 y 72 horas. Los lisados celulares fueron sometidos a detección de UFC. Los datos son mostrados como media \pm SD de tres experimentos independientes. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) * $p < 0.05$

ANEXO 4.



**Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias
Asociación Mexicana de Microbiología**

Ciudad de México a 12 de agosto de 2019

Brisa Marcela Sánchez Camacho
Posgrado Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Presente

Estimado (a) Congresista:

Se le informa que su trabajo:

Role of miR-200a in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection

por:

Brisa Marcela Sánchez Camacho, Olga Noemi Hernández de la Cruz, Mauricio Castañón Arreola

ha sido aceptado para su presentación durante el VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología, a llevarse a cabo del 27 – 31 de octubre de 2019 en la ciudad de Oaxaca, Oax. En fechas próximas se le comunicará modalidad y horario asignado.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. José Luis Puente García

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy

