



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la
Salud y Biomedicina (CICSaB)**



**EVALUACIÓN DE MIRNAS INHIBIDORES DE APOPTOSIS
MODULADOS EN EL MACRÓFAGO DURANTE LA
INFECCIÓN CON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TESIS QUE PRESENTA

Q.F.B. ANAHÍ LUGO SÁNCHEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CO-DIRECTORES DE TESIS

DRA. CARMEN JUDITH SERRANO ESCOBEDO

DR. ROBERTO CARLOS SALGADO DELGADO



Evaluación de miRNAs inhibidores de apoptosis modulados en el macrófago durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 por Anahí Lugo Sánchez se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

NOVIEMBRE 2022

CREDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas (UIBMZ) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la tutoría de la Dra. Carmen Judith Serrano Escobedo, el Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado y la Dra. Mariana Salgado Bustamante, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con número 1084100 a Anahí Lugo Sánchez. Para la realización de este trabajo se utilizaron los recursos pertenecientes a la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS. El proyecto fue registrado y aprobado por la Comisión Nacional Científica del IMSS, misma que tiene un Comité de Ética, bajo el número de registro R-2021-785-002. Además, se contó con el apoyo y participación del Hospital General de Zona No. 1 - Dr. Emilio Varela Lujan del IMSS y del Hospital General Zacatecas del ISSSTE.

Tesis que presenta:

Q.F.B. ANAHÍ LUGO SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dra. Carmen Judith Serrano Escobedo

Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado

ASESORA INTERNA

Dra. Mariana Salgado Bustamante

JURADO

Presidenta de sinodales: Dra. Sofía Bernal Silva

Secretaria de sinodales: Dra. Mariana Salgado Bustamante

Sinodal: Dra. Nadia Saderi

Sinodal suplente: Dra. Esther Layseca Espinosa

NOVIEMBRE 2022

Agradecimientos

A los diversos acordes que armonizaron en las personas imprescindibles en los diferentes ámbitos de mí existir.

A mi madre, María Elsa Sánchez Arellano por su apoyo incondicional hacia las decisiones, metas que me he planteado en la vida y bendecirme con ser mi mamá.

A mis hermanos, Itzel, Carlos y Julio; al igual Mariana, a quien considero mi hermana, a los cuatro por su confianza, velar por mí, siempre tener una palabra de aliento y bendecirme con su ayuda y hermandad.

A la Doctora Carmen Judith Serrano Escobedo, quien tiene un carácter humano que transmite su persona y se refleja en todo lo que realiza, le agradezco por su comprensión, creer en mí como persona, alumna y profesionista, por la oportunidad que me brindó al continuar en su equipo de investigación, además por su paciencia y dedicación en cada una de sus enseñanzas que me motivaron a mejorar y seguir en mi formación en el área de la investigación.

Al Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado, codirector de la presente tesis y Dra. Mariana Salgado Bustamante, asesora de tesis de maestría, ambos por su colaboración en el desarrollo de la presente, apoyo y dedicación en mi formación académica en investigación.

A la Dra. Monica Alejandra Valtierra Alvarado y Dra. María Fernanda Romo García por su dedicación y tiempo al enseñarme las técnicas y análisis de datos que desarrolle en la presente tesis. Reconozco su motivación que me brindaron a mejorar en cada experimento y en la conclusión de los mismos.

A mis compañeros y amigos del posgrado, en especial a Elena, mi amiga y compañera en la ciencia desde la licenciatura, gracias por ser mi compañera de metas, alegrarme con tu presencia honesta y afable, gracias por amenizar mi vida con la calidez de tu amistad; y Alan por su apoyo, comprensión y motivación, gracias por acompañarme no solo en la realización de esta tesis sino también por la calidez y sentimientos de sus palabras con las que siempre externó creer en mí.

A mis amigos Sairi, Gloria, Diana, Claudia, Mariela, Andrea, Johanna, Montse, José, Daniel, Pablo, David y Ulrik por la amistad amena que me han brindado, y Farid Sinaí, mi sobrino, por alegrarme mis días que convivimos. Además de agradecer a mis compañeros de laboratorio por su ayuda y consejos.

A Fátima Dueñas Arteaga quien durante su pasantía de servicio social de medicina y posterior a recibirse como licenciada en medicina implementó estrategias con base en sus conocimientos para la selección y reclutamiento de los individuos participantes.

A la Química Marce por su apoyo, motivación y enseñanzas de laboratorio clínico.

A la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas por permitirme llevar a cabo mi tesis experimental de maestría.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a mis profesores por permitirme formarme como Maestra en Ciencias Biomédicas Básicas, en especial a la Dra. Sofía Bernal Silva con quien aprendí la parte teórica de las técnicas implementadas en la presente tesis, consejos teóricos y su apoyo como presidenta de mi comité sinodal.

Al Conacyt por el apoyo de beca de posgrado con número CVU 1084100.

Agradezco esta bella segunda tertulia y ramillete.

Evaluación de miRNAs inhibidores de apoptosis modulados en el macrófago durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con diabetes mellitus tipo 2

A. Lugo-Sánchez^{1,2}, M.A. Valtierra-Alvarado^{1,2}, R.C. Salgado-Delgado³, M. Salgado Bustamante⁴, S. Bernal-Silva⁴, N. Saderi³, E. Layseca-Espinosa², C.J. Serrano^{1, *}

1. Unidad de Investigación Biomédica Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Zacatecas, México.

2 Departamento de Inmunología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), San Luis Potosí, México.

3. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis de Potosí, México.

4. Posgrado en Ciencias Biomédicas Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

* Autor correspondiente. carmenyuyu2000@yahoo.com.mx

Resumen

Introducción: El cursar con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) con pobre control glicémico implica un mayor riesgo para el desarrollo de tuberculosis (TB), por mecanismos que no están del todo claros. Los macrófagos son células clave en la respuesta inmune en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), durante la cual, cumplen dos funciones, la eliminación del bacilo, pero también su nicho para convertirse en un patógeno persistente. Por lo tanto, no es de sorprender que *Mtb* haya desarrollado mecanismos para evadir la acción del macrófago, entre ellos la evasión de la apoptosis a través de acciones como el incremento de la expresión de miRNAs antiapoptóticos, favoreciendo así la replicación bacteriana y la diseminación de la infección. El mecanismo de regulación de la expresión de miRNAs antiapoptóticos se ha propuesto, a partir de observaciones en diferentes modelos celulares, cepas, multiplicidad de infección (MOI) y cinéticas de infección. Por otro lado, hay evidencia generada en células endoteliales, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con DM2 y líneas celulares de monocitos en condiciones de hiperglucemia que sugiere que las células de los pacientes con DM2 tienen una propensión a apoptosis. No se ha evaluado el efecto conjunto de la diabetes y la infección por *Mtb* de macrófagos sobre la expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis.

Métodos: Macrófagos derivados de monocitos (MDM) de pacientes con DM2 y controles sanos fueron infectados con *Mtb* (H37Rv) a una MOI de 3, por 18 horas y posteriormente fue evaluada por RT-qPCR la expresión relativa de 9 miRNAs inhibidores de apoptosis inducidos durante la infección por micobacterias con el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y normalizado a la expresión de U6.

Resultados: Los niveles de expresión de los miRNAs antiapoptóticos fueron semejantes entre los pacientes con DM2 y los individuos sanos, tanto en la condición basal (antes de infección), como posterior a la infección con *Mtb*.

Conclusión: Los resultados de este estudio en MDMH sugieren que la evasión de la apoptosis mediada por miRNAs en macrófagos infectados con *Mtb* no se da o no se comienza a gestar de manera diferencial por influencia de la DM2 durante la infección temprana con una cepa virulenta de *Mtb* (H37Rv) a MOI baja.

Palabras clave: Diabetes, tuberculosis, macrófagos, miRNA, apoptosis.

Introducción

La diabetes (DM) es un problema de salud pública a nivel mundial que constituye la novena causa de muerte.¹ De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (IDF), para el 2019, 463 millones de personas en todo el mundo (9.3% de los adultos de 20 a 79 años), tenían diabetes. Del total de los pacientes con diabetes, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constituye el 90% de los casos.² Por otro lado, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es el agente etiológico de la tuberculosis (TB), la enfermedad que antes de la pandemia por COVID-19 era la primera causa de muerte por un solo agente infeccioso, causando un estimado de 1.3 millones de fallecimientos en el año 2020.¹ La DM2 se caracteriza por un espectro de cambios metabólicos, inflamatorios y vasculares de carácter crónico que en conjunto contribuyen a la susceptibilidad a infecciones, entre ellas la TB. La DM2 es un obstáculo para el control global de la TB.³

En relación a la comorbilidad DM2-TB se ha reportado a nivel global que el 16% de los casos de TB se asocian a diabetes,⁴ aunque en países como México, las cifras se han reportado en 25%.⁵ La diabetes tiene impacto en la historia natural de la TB ya que los pacientes con DM tienen un mayor riesgo de: 1) desarrollar la TB primaria (3 a 5 veces),⁶ 2) presentar fallas en la respuesta al tratamiento con antitubercóticos y 3) presentar recaídas, reinfección y muerte.⁷ Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas enfermedades confluyen en la comorbilidad DM2-TB, formando una tercera epidemia no están de todo claros. Estudios previos sugieren que la hiperglucemia contribuye a la patología de TB, por lo que mejorar el control glucémico puede favorecer la respuesta al tratamiento de la TB y conducir a un menor riesgo de recaída y reinfección.⁸ Resultados generados en nuestro grupo de investigación mostraron una menor expresión de HLA-DR y CD86, moléculas clave en la presentación de antígeno, tanto en monocitos humanos como en MDM de pacientes con DM2. La expresión de HLA-DR en monocitos se correlacionó negativamente con las concentraciones de hemoglobina glicosilada (HbA1c), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos, mientras las de HLA-DR y CD86 se correlacionaron positivamente con las de lipoproteína de muy baja

densidad (HDL).⁹ Lo que sugiere que el pobre control glicémico y metabólico en los pacientes con DM2 podría favorecer a la infección por *Mtb*, mediante la polarización hacia un fenotipo inmunosuprimido.

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* inicia cuando el bacilo es inhalado y llega a los pulmones donde entra en contacto con el macrófago alveolar que lo fagocita y monta mecanismos microbicidas, a la vez la producción de citocinas y quimiocinas de este fagocito, el cual, recluta a monocitos circulantes al pulmón. Cuando el macrófago no logra contener la infección muere, por apoptosis o necrosis. En el caso de un incremento de prostaglandina E₂ (PGE₂) se direcciona a apoptosis, manteniendo la integridad de la membrana al formarse cuerpos apoptóticos, mismos que serán fagocitados por las células dendríticas encargadas de la presentación de antígeno lo que iniciará la respuesta inmune adaptativa. Es decir, que la muerte del macrófago infectado por apoptosis se considera benéfica para el hospedero. Por otro lado, si se incrementa la lipoxina A4 (LXA4) la muerte se da por necrosis, evento en el que se pierde la integridad de la membrana permitiendo la diseminación de la infección a otras células del hospedero en la cercanía, lo que es benéfico para *Mtb*.¹⁰ Debido a la importancia del macrófago durante la respuesta a la infección por *Mtb* y los desenlaces opuestos en la respuesta inmunológica según el tipo de muerte del macrófago, la micobacteria ha montado los mecanismos que le permiten evadir la apoptosis a través de acciones mediadas por: 1) determinantes antigénicos, 2) producción de citocinas antiapoptóticas y 3) expresión de miRNA antiapoptóticas;¹¹ en el estudio de este último fenómeno se enfocó el presente estudio.

Los miRNA son una clase de pequeños RNA no codificantes de 22 a 25 nucleótidos, que desempeñan un papel indispensable en la regulación postranscripcional y que influyen en una variedad de procesos biológicos, incluyendo la apoptosis y las vías de señalización inmune en respuesta a infecciones de diversos patógenos como *Mtb*.^{12,11} Los miRNA pueden controlar la expresión de los genes que codifican proteínas al dirigirse a una secuencia ubicada en la región 3' no traducida (3'-UTR) de los transcritos diana, lo que resulta en la regulación por represión de la traducción o degradación del mRNA.¹² Una revisión reciente, presentó un modelo de la

expresión de miRNAs antiapoptóticos inducidos durante la infección por micobacterias, el cual se construyó a partir de reportes en la literatura que utilizaron diferentes modelos de macrófagos (de ratón, líneas celulares, macrófagos humanos primarios), infección con diferentes cepas de micobacterias (virulentas o no virulentas para el humano), diferentes tiempos de infección, etc. En el modelo se incluyen 9 miRNAs que tienen acción a diferentes niveles de las vías de señalización que llevan a apoptosis por las vías intrínseca y extrínseca.¹¹ Un resumen de los estudios que se usaron para construir el modelo se mencionan en la Tabla 1. Sin embargo, se desconoce si la misma regulación sucede en macrófagos humanos en respuesta a la cepa virulenta H37Rv de *Mtb* y si ello se modula durante la DM2 en macrófagos provenientes de pacientes.

En la literatura se ha descrito en DM2 el proceso denominado disfunción endotelial, en el que las células expuestas a hiperglucemia sostenida, tienen una producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo, el cual a partir de la activación de la caspasa 3 y de la vía mitocondrial direccionan hacia apoptosis de las células endoteliales.¹³ Adicionalmente, está reportado en la línea celular de macrófagos THP-1 infectados con H37Rv, que en células cultivadas en diferentes concentraciones de glucosa previo a la infección, una mayor concentración de glucosa incrementaba el porcentaje de células en apoptosis.¹⁴ Estudios en pacientes, describieron que a nivel de mRNA de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con DM2 tienen una mayor expresión de los transcrito de las moléculas proapoptóticas Linfoma/leucemia de células B 10 (Bcl-10; del inglés B cell Lyphoma/Leukemia 10)), agonista de la muerte celular asociado a BCL2 (Bad; del inglés Bcl-2-associated death promoter), proteína X asociada a Bcl-2 (Bax; del inglés Bcl-2-associated X protein), agonista de la muerte del dominio interactivo BH3 (Bid; del inglés BH3 interacting-domain death agonist) y caspasa-3 en relación a controles sanos.¹⁵ En conjunto estos resultados sugieren que la diabetes podría ser un factor adicional que altera la respuesta apoptótica en

macrófagos de los pacientes frente a una infección con MTb. Para comenzar a explorar el efecto de la diabetes sobre la respuesta apoptótica inducida durante la infección temprana de macrófagos por *Mtb*, evaluamos la expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis reportados en la literatura,¹¹ en macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMH) de individuos con y sin DM2 antes y después de la infección con *Mtb* H37Rv.

Materiales y métodos

Individuos participantes

El protocolo fue aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), que incluye un Comité de Bioseguridad y Bioética, bajo el número de registro R-2021-785-002. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los individuos participantes. Los individuos sanos (No DM2) y pacientes con DM2 diagnosticados de acuerdo con los criterios de la American Diabetes Association (ADA) fueron reclutados entre mayo 2019 y enero 2020. Todos ellos eran derechohabientes de los hospitales H.G.Z.1, Dr. Emilio Varela Lujan, IMSS y H.G.26, ISSSTE, del estado de Zacatecas Zac. México. Los participantes fueron evaluados por un médico, quien realizó una historia clínica completa. Los individuos incluidos en el estudio no presentaban antecedentes de TB o signos y síntomas atribuibles a la enfermedad. Se registró evaluación del historial médico y el examen físico del participante por un número de folio para la confidencialidad de los datos, se incluyeron las mediciones de altura, peso, índice de masa corporal (IMC), presión arterial, palpación de tiroides, examen cardiovascular. Se realizaron las mediciones bioquímicas siguientes: glucosa en ayunas, HbA1c, biometría hemática, perfil lipídico, albúmina y creatinina séricas, examen general de orina y se evaluó la tasa de filtración glomerular. Individuos con alguno de los siguientes criterios no fueron incluidos en el estudio: hipotiroidismo, alcoholismo positivo, tabaquismo positivo, complicaciones derivadas de la DM2 (retinopatía avanzada, nefropatía y/o neuropatía), infecciones de cualquier tipo al

momento de la toma de muestra, obesidad mórbida, o en tratamiento farmacológico con insulina, estatinas, y/o inmunosupresores.

Aislamiento-purificación de monocitos humanos, diferenciación a macrófagos derivados de monocitos y obtención de muestras control en TRIzol

Se tomó una muestra de sangre venosa periférica en tubos con EDTA, de la cual se separaron las CMSP usando un gradiente de densidad con Lymphoprep (AXIS-SHIELD, Scotland). Se purificaron los monocitos por selección negativa con el Kit Pan Monocyte Isolation Kit Human (Miltenyi, USA) y columnas magnéticas LD MACS (Miltenyi, USA). Para la diferenciación a MDM, los monocitos purificados se resuspendieron en RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, USA) se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 células/pozo en placas de 6 pozos (NEST, China), posterior a la adherencia por 2 horas, se lavaron las células no adheridas y se adicionó el medio de diferenciación constituido por RPMI-1640 suplementado con suero autólogo al 10%, 20 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, Miltenyi, USA) 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich, USA) 1% de piruvato (Sigma Aldrich, USA) y 0,1% de 2-beta-mercaptoetanol (Gibco Life Technologies, USA). Al día 3, se reemplazó por medio nuevo el 50% del medio de cultivo y al día 6 ó 7 se recolectaron los MDM usando el buffer de disociación celular "Cell Dissociation buffer" (Gibco, USA) para el análisis de la viabilidad celular; otra alícuota de los MDM (1.5×10^6 células) se lavaron y lisaron en 1ml de TRIzol (Ambion, USA) y se conservaron a -70°C hasta el aislamiento del RNA total de todos los lotes a analizar.

Determinación de viabilidad celular por citometría de flujo

En los MDM (3×10^6 células) recuperados con Buffer de disociación celular (Gibco, USA), la viabilidad se determinó utilizando la tinción con Live/dead Fixable Violet Dead Cell (Invitrogen Life technologies, USA) durante 30 min en hielo y protegido de la luz. Posteriormente se realizó un lavado con buffer fosfato salino 1X (PBS 1X) y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% para su posterior adquisición en citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA.). El análisis de los datos de citometría de flujo se realizó con el software FlowJo VX (BD, USA.).

Preparación, infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y obtención de las muestras de infección en TRIzol

Para todos los experimentos de infección se utilizó la cepa de referencia de *Mtb* H37Rv. Se realizó el cultivo de Mtb en medio Middlebrook 7H9 (BD, Sparks, MD, USA) suplementado con 10% ADC (BD, USA) y 0.05% de Tween-80 (Sigma-Aldrich, USA) se permitió su crecimiento hasta la fase logarítmica. La concentración bacteriana se determinó por densidad óptica a 600nm. La infección se realizó en los macrófagos sembrados en las placas a una multiplicidad de 3 bacterias por macrófago (MOI 3:1) por 18 horas. Se recolectaron los MDM usando una solución amortiguadora de disociación celular comercial "Cell Dissociation buffer" (Gibco, USA) para el análisis de la viabilidad celular; otra alícuota de los MDM (1.5×10^6 células) se lavaron y lisaron en 1ml de TRIzol (Ambion, USA) y se conservaron a -70°C hasta el aislamiento del RNA total.

Extracción de RNA total y RT-qPCR

El RNA total fue purificado con el Kit Zymo Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, USA). Para la transcripción reversa se partió de 90ng de RNA total disueltos en 2 μl de H₂O DEPC, en un volumen total mezcla de reacción de 20 μl compuesto por 1 μl de dNTP's (10 μM), 1 μl oligo stem-loop (oligo de Chen; 60 μM), 1 μl primer U6 RT (10 μM), 1 μl de transcriptasa reversa (200U/ μl ; GOLDBIO, USA) 2 μl de buffer de reacción RT 10X (GOLDBIO, USA) y 12 μl de H₂O DEPC. Para la síntesis del cDNA la mezcla de reacción fue incubada en el Termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) a 60°C por 5 min (hibridación), 25°C por 10 min, seguido de 42°C por 20 min (Polimerización del cDNA) y finalmente a 65°C por 20 min (inactivación enzimática por calor).

Los miRNA inhibidores de apoptosis fueron evaluados por qPCR utilizando SsoFast-Eva green (BIO-RAD, USA) en un termociclador en tiempo real Light Cycler 480 (Roche, USA). Los 10 μl de volumen de reacción contenían 2 μl de cDNA (45ng/ μl), 5 μl de SsoFast-Eva Green PCR Supermix, 1 μl de oligo *forward* (1 μM) y 1 μl de oligo *reverse* (1 μM) y 2 μl de H₂O DEPC. El programa de ciclos de PCR se

realizó a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 seg, 62°C (50°C para el miR-29a-5p) 36 seg,¹⁶ por último para la curva melting de 65°C a 95°C por 30 seg y 1 ciclo de enfriado a 37°C por 30 seg. Los niveles de expresión relativa de los miRNA se calcularon usando los valores de Ct (*threshold cycle*) por duplicado y cuantificados por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado a la expresión de U6.¹⁷ Las secuencias de los oligos para la transcripción reversa fueron : Oligo para U6 5'- GCG TGT CAT CCT TGC GCA GGG-3' y oligo Chen 5'- GAA AGA AGG CGA GGA GCA CGA GGAA GAA GAC GGA AGA ATG TGC GTC TCG CCT TCT TTC NNNNNNNN-3'.¹⁸ Para qPCR, se utilizaron: *forward* U6 5'GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AA-3, *reverse* U6 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC-3', let-7b-5p 5'- GTG AGG TAG TAG GTT GTG TGG T-3', let-7e-5p 5'- GTG AGG TAG GAG GTT GTA TAG TT-3', miR-29-3p 3'- GTA GCA CCA TCT GAA ATC GGT TA-3', miR-21-5p 5'- GGT AGC TTA TCA GAC TGA TGT TG-3', miR-582-5p 5'- GGT TAC AGT TGT TCA ACC AGT TAC-3', miR-223-3p 5'-GTG TCA GTT TGT CAA ATA CCC CA-3', miR-20a-5p 5'- GTA AAG TGC TTA TAG TGC AGG TAG-3', miR-20b-5p 5'- CAA AGT GCT CAT AGT GCA GGT AG-3', miR-155-5p 5'- GTT AAT GCT AAT CGT GAT AGG GGT T-3' y el *Universal Reverse primer* para miRNAs 5'- ACG AGG AAG AAG ACG GAA GAA T-3'.

Análisis estadístico

Las características clínicas entre los individuos No DM2 y DM2 se compararon mediante una prueba U de Mann-Whitney. La viabilidad de los MDMH, la expresión de U6 y los datos de RT-qPCR de los miRNAs inhibidores de apoptosis se compararon entre las 4 condiciones evaluadas a través de la prueba Kruskal-Wallis, asumiendo que no tienen una distribución normal debido al tamaño de la muestra. Un valor de *P < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., USA).

Resultados

Características clínicas de los individuos participantes

Se realizó un análisis de las características clínicas de los pacientes con DM2 respecto al grupo de individuos sin DM2 para verificar que los resultados obtenidos se deban únicamente a los parámetros clínicos asociados a la diabetes e identificar aquellas variables que podría tener alguna influencia en los resultados. La comparación de las mediciones clínicas entre pacientes con DM2 y sujetos sanos se resume en la Tabla 1. Los grupos mostraron edades diferentes y no se encontraron diferencias significativas en el IMC, colesterol total y colesterol LDL. Como era de esperarse dados los criterios de inclusión, los pacientes con DM2 mostraron valores más altos de glucosa, HbA1c, triglicéridos y VLDL, pero niveles más bajos de colesterol HDL y creatinina sérica (*P <0.05). Por lo tanto, estas características clínicas implican que los resultados de las variables que se evaluaron en nuestro estudio son un reflejo del estado celular inherente a la DM2.

En cuanto al esquema de tratamiento farmacológico, el 100% de los pacientes con DM2 estaba siendo tratado con Metformina más Glibenclamida y ninguno había sido tratado con insulina. Además el 40% de los sujetos en el grupo DM2 cursaba con hipertensión.

La viabilidad celular en las MDMH es semejante en las condiciones experimentales en estudio.

Se determinó la viabilidad de las MDMH para verificar que los resultados obtenidos no estén influidos por errores metodológicos que hayan comprometido a las células previo a la extracción de RNA y síntesis de cDNA. Como se muestra en la Figura 1 las cuatro condiciones experimentales mostraron porcentajes de células vivas similares y mostrando una media igual o mayor al 80% de viabilidad ($p=0.5075$). La concentración y pureza posterior a la síntesis de los 34 cDNAs derivados de estas células se muestran en la Tabla suplementaria S1.

La expresión de U6 es estable en las condiciones de estudio por lo que consideró como un snRNA constitutivo.

Se evaluó la expresión relativa de U6 en las 34 muestras de cDNA correspondientes a los individuos sin DM2 y a los pacientes con DM2 para corroborar que U6 tiene niveles de expresión constante en nuestras condiciones experimentales (No DM2: Basal y H37Rv; DM2: Basal y H37Rv). Para el cálculo se utilizó la primera delta ($\Delta Ct = Ct \text{ tiempo } X - Ct \text{ tiempo } 0$) y se calculó la $2^{-\Delta Ct}$ de U6. Como se observa en la Figura 2 no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de U6 entre las 4 condiciones ($p = 0.9321$), por lo tanto, se considera un snRNA de expresión constitutiva y adecuado para normalizar el análisis de expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis.

La DM2 y la infección con Mtb no tienen efecto en los niveles de expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis.

Para determinar si la DM2 y la infección con H37Rv generan cambios en los niveles de expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis se evaluó la expresión relativa de los 4 grupos de estudio por el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como se observa en la Figura 3 no se encontraron diferencias significativas para los niveles de expresión entre las 4 condiciones de estudio (No DM2 Basal, No DM2 H37Rv, DM2 Basal y DM2 H37Rv). Obteniéndose los siguientes valores estadísticos: miRNA let-7b-5p ($p = 0.4631$), miRNA let-7e-5p ($p = 0.6244$), miR-29a-3p ($p = 0.6095$), miR-21-5p ($p = 0.5382$), miR-582-5p ($p = 0.6244$), miR-223-3p ($p = 0.1103$), miR-20a-5p ($p = 0.9357$), miR-20b-5p ($p = 0.4486$) y miR-155-5p ($p = 0.0742$). Por consiguiente, los resultados de expresión relativa de los miRNAs antiapoptóticos en MDMH indican que ni la DM2, ni la infección con Mtb tienen efecto sobre la expresión de los miRNAs evaluados. En la Figura suplementaria S2 se muestran las curvas de amplificación y las curvas *melting* para los miRNA evaluados por RT-qPCR. Mientras que la Figura suplementaria S3 muestra los amplímeros de qPCR identificados como bandas únicas por electroforesis en geles de agarosa.

Discusión

Mycobacterium tuberculosis puede sobrevivir en el interior del macrófago, porque a pesar de que esta célula es su principal fagocito, el bacilo ha desarrollado la capacidad de evadir la respuesta inmune a varios niveles incluyendo la inhibición de la muerte por apoptosis del macrófago infectado, por lo que la muerte de un macrófago que no ha podido controlar la proliferación de *Mtb* se da por necrosis, con la consecuente diseminación de la infección por el pulmón. Hay evidencias de la regulación por miRNAs de la respuesta inmune del hospedero y éste es uno de los mecanismos de modulación que *Mtb* usa su favor. Aunado a ello, patologías como la DM2 favorecen la infección por *Mtb* y el desarrollo de TB, sin que se haya estudiado si la modulación de miRNAs está adicionalmente involucrada en tales mecanismos de susceptibilidad.¹⁹

En el presente estudio analizamos el perfil de expresión de 9 miRNAs que en base a distintos reportes de la literatura se usaron para construir un modelo en el que se muestran asociados con la inhibición de la apoptosis durante la infección de macrófagos por micobacterias (Tabla 1).¹¹ Sin embargo, hasta ahora ningún estudio se ha centrado en analizar el efecto en la expresión de los miRNAs antiapoptóticos durante la DM2 en macrófagos humanos antes ni después de la infección por *Mtb*. En el presente estudio piloto evaluamos por lo tanto el efecto de la DM2, como el de la infección por *Mtb* de macrófagos humanos sobre la expresión del grupo seleccionado de miRNAs, usando un modelo que correspondería a la etapa de infección del macrófago que de ser productiva sería la base para el establecimiento de la comorbilidad DM2-TB. En nuestro modelo experimental de MDMH infectados con H37Rv, a una MOI de 3, durante 18 hr, no se encontraron diferencias significativas entre los MDM de individuos con y sin DM2, ni antes, ni después de la infección con *Mtb*. En los siguientes párrafos se comenta contrastando con la literatura cuáles pueden ser las razones que explican nuestros resultados, lo que puede estar relacionado con el modelo de macrófagos usado, la especie animal de donde provenían los macrófagos, la especie y virulencia de la cepa de micobacteria

infectante, la multiplicidad de infección utilizada y el tiempo de la infección al que se evaluaron los miRNAs.

Contrastando con lo publicado, las evaluaciones de la expresión de miRNAs antiapoptóticos que realizamos no serían del todo comparables entre los diferentes modelos de macrófagos y los tiempos de infección temprana *in vitro* con *Mtb*, sin embargo, aportan información sobre el comportamiento en MDM de miRNAs antiapoptóticos modulados por la infección con *Mtb* en macrófagos de sujetos sanos y en aquellos provenientes de pacientes con DM2, sobre lo que no se ha publicado ningún dato hasta ahora.

Los estudios previamente reportados se realizaron en modelos de macrófagos muy diversos, en los que se ha reportado que los MDMH y los macrófagos murinos tienen diferentes respuestas ante distintos estímulos de polarización hacia macrófagos M1 y M2, siendo más claro en el estímulo de LPS (M1) en ratones, durante el cual presentan expresión de receptores scavenger (M2) y carecen de la producción de quimiocinas.²⁰ Aunado a ello, los modelos murinos de TB no presentan necrosis y lesiones cavitarias,²¹ lo que sugiere que ante la infección por *Mtb* los macrófagos murinos podrían tener una expresión de miRNAs muy diferente a la del humano, es decir, puede tratarse de un fenómeno especie-específico. En cuanto a los modelos con líneas celulares, los MDMH y macrófagos THP-1 ante la infección por *Mtb*, no mostraron diferencias significativas en los ensayos de unidades formadoras de colonias o en la evaluación del miR-223-3p.^{22,23} De modo similar al comparar la expresión del miR-21-5p no se encontraron diferencias significativas en su regulación en las líneas celulares THP-1 y RAW264.7 posterior a la infección.²⁴ Lo que implica que las respuestas entre líneas celulares comparadas con MDMH podrían ser parcialmente equivalentes.

Con respecto a los estudios realizados en MDMH los reportes publicados evaluaron pacientes con TB activa,¹¹ por lo que las respuestas ante la infección, mecanismos de evasión y regulación de miRNAs en la enfermedad ya establecida o productiva puede ser muy diferente a la de nuestro modelo de macrófagos, en el que evaluamos la primoinfección 18 hr después de exponer los MDMD a *Mtb* y donde

encontramos viabilidades celulares semejantes en las cuatro condiciones experimentales. Por lo que, no se tiene certeza de si los mecanismos de apoptosis o necrosis ya han comenzado y se han activado los mecanismos antiapoptóticos. También es importante mencionar, que los miRNAs fueron cuantificados solamente en un solo tiempo a las 18 h, por lo que, probablemente se requiera realizar una cinética a la par de la apoptosis y la cuantificación a diferentes tiempo una vez que comienza este mecanismo celular. Se requiere ampliar el estudio, considerando incluir diferentes tiempo post-infección y monitorear la inducción de apoptosis para conocer el tiempo adecuado en el cual se activan de manera diferencial los niveles de expresión de los miRNA inhibidores de apoptosis en los MDMH en las células provenientes de sujetos control (sin DM2) o de pacientes con DM2 infectados por la micobacteria.

Así mismo la cepa y el grado de virulencia de la micobacteria utilizada en la infección *in vitro* tienen diferente impacto en el direccionamiento hacia la vía de muerte del macrófago. Se ha observado que las cepas de micobacterias de baja virulencia, como BCG o avirulentas, como Mtb H37Ra, son mejores inductores de la apoptosis de macrófagos en comparación con las micobacterias más virulentas, como Mtb H37Rv. Es decir, que las cepas virulentas pueden evadir la apoptosis de los macrófagos e inducir la necrosis evitando la muerte bacteriana y la presentación de antígeno.^{25, 26} En el presente trabajo no observamos un efecto adicional dado por la DM2 sobre la expresión de miRNAs antiapoptóticos en macrófagos infectados con una cepa medianamente virulenta de referencia (H37Rv).

Después de la infección a una MOI baja, *Mtb* crece en los macrófagos suprimiendo la apoptosis y posteriormente cuando la carga bacilar intracelular supera un umbral de aproximadamente 20 bacterias por macrófago la célula muere por necrosis.²⁷ Aunado al efecto de la MOI en el tipo de muerte celular, la cinética de infección se ha evaluado por ensayos de apoptosis y necrosis, observando las células necróticas positivas para yoduro de propidio (PI) detectables dentro de las 6 horas posteriores a la infección con MOI alta de 25 y una muerte casi completa de los cultivos de macrófagos infectados a las 20 hr,²⁷ lo que se relaciona con la cinética de mayor expresión reportada en la literatura para los miRNAs inhibidores de apoptosis a 24

y 48 hr posterior a la infección.¹¹ En contraste a nuestro estudio realizado con una MOI baja de 3 a una cinética de 18 hr que mimetiza las primeras etapas de la infección cuando la infección se transmite de un individuo con TB activa a otro que inhala el aire en la cercanía. Por lo anterior, la evaluación de un punto de infección temprana a MOI baja, podía no estar registrando una expresión diferencial en la condición basal y después de la infección con *Mtb* entre DM2 y no DM2 si la hubiera. En resumen, todos los modelos de estudio tienen limitaciones y en las condiciones en que realizamos nuestros experimentos piloto para macrófagos humanos y con una cepa de *Mtb* virulenta, no se comprueba el modelo sugerido y construido en base a distintos tipos celulares, cepas, MOI, cinéticas, etc.,¹¹ pero es un primer acercamiento a un modelo de primoinfección en macrófagos humanos tanto de sujetos sanos como de individuos con DM2. El presente estudio establece las bases para continuar con el estudio de mecanismos moleculares que involucran microRNAs y su participación en la respuesta de macrófagos ante la infección por *Mtb*.

Otra de las razones por las que podríamos no haber encontrado diferencias en el presente estudio pueden estar relacionadas con las características clínicas de los pacientes o con el tratamiento farmacológico para DM2 que reciben. En este sentido, Al Dubayee y cols.¹⁵ analizaron por RT-qPCR el mRNA de varios miembros de la familia Bcl-2 (proteínas pro y anti-apoptóticas), así como de las caspasas -3, -7, -8 y -9 en CMSP aisladas de personas con normopeso, obesas, pacientes con DM2 y pacientes con DM2 tratados con metformina. En relación al porcentaje de HbA1c, no hay una diferencia entre el control glicémico entre los pacientes con tratamiento y sin tratamiento con metformina (HbA1c 8.7 ± 0.35 vs. HbA1c 8.0 ± 0.62). Estos autores sin embargo, reportaron un incremento en la expresión de los transcritos de las proteínas proapoptóticas Bcl-10, Bax, Bad, Bid y caspasa-3 y niveles disminuidos de caspasa-7 en las CMSP de pacientes con DM2 no tratados farmacológicamente respecto al grupo de normo peso y obesidad. Adicionalmente, en sujetos bajo tratamiento con metformina en relación al grupo de pacientes con DM2 sin tratamiento, la expresión del mRNA para Bcl-10, Bid y caspasa-3 fue más baja y más alta para la vía Bad/Bax/caspasa-7. Estos resultados sugieren que el

tratamiento anti hiperglicemiante (independientemente del grado), influye sobre la propensión a apoptosis de CMSP (donde están contenidos los monocitos precursores de los MDM). Dado que en este reporte se estudiaron CMSP (mezcla de monocitos y linfocitos), no podemos discriminar directamente si la metformina afecta la maquinaria de apoptosis en los monocitos, lo que tendría que evaluarse en estudios futuros en MDMH que incluyan grupos de pacientes con DM2 con tratamiento y sin tratamiento farmacológico.

En pacientes recién diagnosticados con DM2 (vírgenes a tratamiento antihiperglicemiante), se ha reportado en plasma que let-7a-5p tiene como blanco a CASP3²⁸. Este miRNA se disminuye en pacientes con DM2 con pobre control glicémico (HbA1c de 9.6% \pm 1.5%) en relación al grupo control sin DM2.²⁹ Por consiguiente, estos datos se suman a la evidencia de que los pacientes con diabetes descontrolada y sin tratamiento farmacológico tienen una propensión hacia apoptosis, al menos por esta vía de regulación.

El miRNA let-7a-5p, tiene también como blanco a DICER,²⁸ la enzima que escinde el bucle de los pre-miRNA y genera dúplex de miRNA maduros,¹² por lo que la disminución de la traducción de DICER da como resultado la disminución de la expresión de let-7a-5p, además su sobreexpresión disminuyó la expresión de otros miRNAs maduros.³⁰ En conjunto estos reportes sugieren un bucle de retroalimentación negativa, en el que let-7 es un miRNA clave para regular el equilibrio entre DICER y otros miRNAs.³⁰ Durante el tratamiento con metformina en relación a la condición sin tratamiento de células MCF-7, se incrementa la expresión de let-7e,³¹ favoreciendo la inhibición de la apoptosis, pero incrementa el transcrito y proteína de DICER en CMSP de pacientes con DM2 en relación al grupo control sin DM2,³² lo que explicaría parcialmente el incremento de let-7e y otros miRNAs, incluidos quizás también los que estudiamos en la presente tesis. En conjunto esta evidencia de la literatura sugiere que si no hay un buen control glicémico existe un efecto a nivel del transcriptoma, lo que podría influir en que no encontramos diferencias significativas en la expresión de los miRNAs evaluados, ya que si bien en la DM2 hay una propensión hacia apoptosis, que se reflejaría como una expresión menor de los miRNAs inhibidores de apoptosis en relación al grupo

control, el tratamiento con metformina administrado al grupo de pacientes con DM2 reclutados para el presente estudio pudiera estar incrementando la expresión y por ende en el balance final no encontramos diferencias entre las condiciones basales (No DM2 basal y DM2 basal).

Nuestros pacientes en estudio recibían un tratamiento conjunto de metformina (biguanida) y glibenclamida (sulfonilurea), para la glibenclamida no hay estudios que reporten afectación a nivel de la expresión de miRNAs, pero no hay una diferencia significativa para el caso de la expresión relativa de DICER comparando pacientes tratados con sulfonilureas e individuos sin DM2.³² Esto sugiere que la glibenclamida podría no interferir con la expresión de miRNAs evaluados en el presente estudio.

En contraste a lo comentado en pacientes con DM2 y los miRNAs de la familia let-7, en pacientes con TB se observó que la expresión de circRNA_101128 en CMSP correlacionó negativamente con el nivel de su posible blanco let-7a. Esta interacción puede desempeñar un impacto desfavorable para el hospedero en la respuesta de las CMSP a la infección por *Mtb*.³³ Lo que podría explicar parcialmente porqué en nuestro modelo de infección temprana por *Mtb* no observamos diferencias significativas en la expresión de los miRNAs, por mecanismos de regulación que posiblemente se montan hasta la infección avanzada o durante la TB activa como en el caso de los circRNA.

Cabe mencionar que el grupo de sujetos que incluimos en nuestro estudio fue reclutado antes de la pandemia de COVID-19, por lo que en futuros estudios tendrían que compararse nuestros resultados con los de la población actual que en un alto porcentaje ha sido infectada por SARS-CoV-2 y/o vacunada. Este aspecto es interesante porque hay evidencia de que en CMSP de pacientes con COVID-19 los porcentajes de células apoptóticas son mayores en relación a los de individuos control. De igual manera durante el curso de la enfermedad el porcentaje es mayor en pacientes en un estadio severo respecto a los pacientes durante la fase temprana de la enfermedad.³⁴ En relación a la célula de interés para este estudio, se ha reportado en monocitos que en individuos post-infección aguda por SARS-CoV-2 se incrementaron los monocitos intermedios (CD14++ CD16+) y no clásicos (CD14+

CD16++) comparado con un grupo de pacientes con COVID severo e individuos sanos. Este efecto se registró hasta 15 meses después de la infección aguda en comparación con controles sanos.³⁵ Para el caso de la expresión de HLA-DR, molécula presentadora de antígeno, se disminuyen tanto la proporción de monocitos positivos, como la densidad de expresión a medida que se progresa por los diferentes estadios de la enfermedad (leve, moderado, severo y crítico) en relación a los controles sanos.^{36,37} En lo que respecta a la DM2 en los pacientes que cursan con COVID-19 el porcentaje de monocitos clásicos (CD14++ CD16-), subpoblación clave en las respuestas antimicrobianas,³⁸ disminuye en relación a pacientes sin DM2-COVID-19.³⁹ En resumen, entre los pacientes COVID y post-COVID hay un espectro de respuestas en cuanto al direccionamiento hacia apoptosis y se modifican las subpoblaciones de monocitos con incremento en las de carácter no inflamatorio en respuesta antiviral, disminuyendo las que participan en procesamiento y presentación de antígenos. Esta situación por tanto, podría ser un factor confusor para la evaluación de nuestra variable de interés, por lo que no se pudo incrementar el tamaño de muestra. Dado que por el momento no se podría discriminar si el efecto es por la DM2, la infección con *Mtb* y/o las consecuencias inmunológicas del COVID-19. Por consiguiente, los individuos reclutados post-COVID en esta etapa en la que continuamos con la pandemia, no serían homólogos con las 34 muestras de cDNA pre-COVID que se evaluaron en el presente estudio.

Limitaciones. Las limitaciones de nuestro estudio piloto incluyen a) Tamaño de muestra b) Inclusión de pacientes bajo tratamiento farmacológico con metformina y no un grupo virgen al tratamiento o bajo otros tratamientos farmacológicos, c) Infección realizada con una sola MOI y una sola cepa de *Mtb*, una sola medición de cuantificación de miRNAs d) Los resultados son válidos para la fisiología de los pacientes con DM2 bajo los estrictos criterios de inclusión utilizados y considerando que fueron evaluados antes de la pandemia por SARs-Cov2.

Conclusión

Los resultados de este estudio en MDMH sugieren que la evasión de la apoptosis mediada por miRNAs en macrófagos infectados con *Mtb* no se da o no se comienza a gestar de manera diferencial por influencia de la DM2 durante la infección temprana con una cepa virulenta de *Mtb* (H37Rv) a MOI baja.

Referencias

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021.*; 2021.
2. Internacional Diabetes Federation. Global picture and Diabetes by region. In: *IDF Diabetes Atlas*. 9ª edición. ; 2019:34-45.
3. Ronacher K, van Crevel R, Critchley JA, et al. Defining a Research Agenda to Address the Converging Epidemics of Tuberculosis and Diabetes. *Chest*. 2017;152(1):174-180. doi:10.1016/j.chest.2017.02.032
4. Segura-Cerda CA, López-Romero W, Flores-Valdez MA. Changes in Host Response to Mycobacterium tuberculosis Infection Associated With Type 2 Diabetes: Beyond Hyperglycemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9. doi:10.3389/fcimb.2019.00342
5. Critchley JA, Restrepo BI, Ronacher K, et al. Defining a Research Agenda to Address the Converging Epidemics of Tuberculosis and Diabetes. *Chest*. 2017;152(1):165-173. doi:10.1016/j.chest.2017.04.155
6. Restrepo BI. Diabetes and Tuberculosis. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6). doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0023-2016
7. Restrepo BI, Schlesinger LS. Impact of diabetes on the natural history of tuberculosis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106(2):191-199. doi:10.1016/j.diabres.2014.06.011
8. Ngo MD, Bartlett S, Ronacher K. Diabetes-Associated Susceptibility to Tuberculosis: Contribution of Hyperglycemia vs. Dyslipidemia. *Microorganisms*. 2021;9(11):2282. doi:10.3390/microorganisms9112282
9. Valtierra-Alvarado MA, Castañeda Delgado JE, Ramírez-Talavera SI, et al. Type 2 diabetes mellitus metabolic control correlates with the phenotype of human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Diabetes Complications*. 2020;34(11):107708. doi:10.1016/j.jdiacomp.2020.107708
10. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):475-527. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095939
11. Abdalla AE, Ejaz H, Mahjoob MO, et al. Intelligent Mechanisms of Macrophage Apoptosis Subversion by Mycobacterium. *Pathogens*. 2020;9(3):218.

doi:10.3390/pathogens9030218

12. Zhao Y, Wang Z, Zhang W, Zhang L. MicroRNAs play an essential role in autophagy regulation in various disease phenotypes. *BioFactors*. 2019;45(6):844-856. doi:10.1002/biof.1555
13. van den Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:1-15. doi:10.1155/2010/792393
14. Kundu J, Verma A, Verma I, Bhadada SK, Sharma S. Molecular mechanism of interaction of Mycobacterium tuberculosis with host macrophages under high glucose conditions. *Biochem Biophys Reports*. 2021;26:100997. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100997
15. Al Dubayee M, Alshahrani A, Aljada D, et al. Gene Expression Profiling of Apoptotic Proteins in Circulating Peripheral Blood Mononuclear Cells in Type II Diabetes Mellitus and Modulation by Metformin. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2021;Volume 14:1129-1139. doi:10.2147/DMSO.S300048
16. Romo-García MF, Bastian Y, Zapata-Zuñiga M, et al. Identification of putative miRNA biomarkers in early rheumatoid arthritis by genome-wide microarray profiling: A pilot study. *Gene*. 2019;720:144081. doi:10.1016/j.gene.2019.144081
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
18. Yang L, Wang S, Tang L, et al. Universal Stem-Loop Primer Method for Screening and Quantification of MicroRNA. Hoheisel JD, ed. *PLoS One*. 2014;9(12):e115293. doi:10.1371/journal.pone.0115293
19. Cheng P, Wang L, Gong W. Cellular Immunity of Patients with Tuberculosis Combined with Diabetes. Wang R, ed. *J Immunol Res*. 2022;2022:1-12. doi:10.1155/2022/6837745
20. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
21. Singh A, Gupta U. Animal models of tuberculosis: Lesson learnt. *Indian J Med Res*. 2018;147(5):456. doi:10.4103/ijmr.IJMR_554_18
22. Mendoza-Coronel E, Castañón-Arreola M. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study. Brennan P, ed. *Pathog Dis*. 2016;74(6):ftw052. doi:10.1093/femspd/ftw052
23. Xi X, Zhang C, Han W, Zhao H, Zhang H, Jiao J. MicroRNA-223 Is Upregulated in Active Tuberculosis Patients and Inhibits Apoptosis of Macrophages by Targeting FOXO3. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015;19(12):650-656.

doi:10.1089/gtmb.2015.0090

24. Zhao Z, Hao J, Li X, Chen Y, Qi X. MiR-21-5p regulates mycobacterial survival and inflammatory responses by targeting Bcl-2 and TLR4 in Mycobacterium tuberculosis -infected macrophages. Dalmay T, ed. *FEBS Lett.* 2019;593(12):1326-1335. doi:10.1002/1873-3468.13438
25. Lam A, Prabhu R, Gross CM, Riesenber LA, Singh V, Aggarwal S. Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2017;313(2):L218-L229. doi:10.1152/ajplung.00162.2017
26. Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. Macrophage Apoptosis in Response to High Intracellular Burden of Mycobacterium tuberculosis Is Mediated by a Novel Caspase-Independent Pathway. *J Immunol.* 2006;176(7):4267-4274. doi:10.4049/jimmunol.176.7.4267
27. Lee J, Hartman M, Kornfeld H. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis. *Yonsei Med J.* 2009;50(1):1. doi:10.3349/yjmj.2009.50.1.1
28. Kern F, Aparicio-Puerta E, Li Y, et al. miRTargetLink 2.0 - Interactive miRNA target gene and target pathway networks. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W409-W416. doi:10.1093/NAR/GKAB297
29. Santovito D, De Nardis V, Marcantonio P, et al. Plasma Exosome MicroRNA Profiling Unravels a New Potential Modulator of Adiponectin Pathway in Diabetes: Effect of Glycemic Control. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):E1681-E1685. doi:10.1210/jc.2013-3843
30. Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis.* 2008;29(11):2073-2077. doi:10.1093/carcin/bgn187
31. Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Vazquez-Martin A, et al. Micro(mi)RNA expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin: Induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGF β -induced oncomiR miRNA-181a. *Cell Cycle.* 2011;10(7):1144-1151. doi:10.4161/cc.10.7.15210
32. Noren Hooten N, Martin-Montalvo A, Dluzen DF, et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell.* 2016;15(3):572-581. doi:10.1111/accel.12469
33. Fu Y, Wang J, Qiao J, Yi Z. Signature of circular RNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with active tuberculosis. *J Cell Mol Med.* 2019;23(3):1917-1925. doi:10.1111/jcmm.14093
34. Taghiloo S, Aliyali M, Abedi S, et al. Apoptosis and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Iranian COVID-19 patients: Clinical and laboratory characteristics. *J Med Virol.* 2021;93(3):1589-1598. doi:10.1002/jmv.26505
35. Patterson BK, Francisco EB, Yogendra R, et al. Persistence of SARS CoV-2

- S1 Protein in CD16+ Monocytes in Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) up to 15 Months Post-Infection. *Front Immunol.* 2022;12. doi:10.3389/fimmu.2021.746021
36. Ekşioğlu-Demiralp E, Alan S, Sili U, et al. Peripheral innate and adaptive immune cells during COVID-19: Functional neutrophils, pro-inflammatory monocytes, and half-dead lymphocytes. *Cytom Part B Clin Cytom.* 2022;102(2):153-167. doi:10.1002/cyto.b.22042
 37. Qin S, Jiang Y, Wei X, et al. Dynamic changes in monocytes subsets in COVID-19 patients. *Hum Immunol.* 2021;82(3):170-176. doi:10.1016/j.humimm.2020.12.010
 38. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:1-13. doi:10.3389/fimmu.2019.02035
 39. Alzaid F, Julla J, Diederheim M, et al. Monocytopenia, monocyte morphological anomalies and hyperinflammation characterise severe COVID-19 in type 2 diabetes. *EMBO Mol Med.* 2020;12(10). doi:10.15252/emmm.202013038
 40. Liu Y, Jiang J, Wang X, Zhai F, Cheng X. miR-582-5p Is Upregulated in Patients with Active Tuberculosis and Inhibits Apoptosis of Monocytes by Targeting FOXO1. Spencer J, ed. *PLoS One.* 2013;8(10):e78381. doi:10.1371/journal.pone.0078381
 41. Rothchild AC, Sissons JR, Shafiani S, et al. MiR-155–regulated molecular network orchestrates cell fate in the innate and adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(41). doi:10.1073/pnas.1608255113
 42. HUANG J, JIAO J, XU W, et al. miR-155 is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO3. *Mol Med Rep.* 2015;12(5):7102-7108. doi:10.3892/mmr.2015.4250
 43. Sharbati J, Lewin A, Kutz-Lohroff B, Kamal E, Einspanier R, Sharbati S. Integrated MicroRNA-mRNA-Analysis of Human Monocyte Derived Macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection. Agrewala JN, ed. *PLoS One.* 2011;6(5):e20258. doi:10.1371/journal.pone.0020258
 44. Zhang G, Liu X, Wang W, et al. Down-regulation of miR-20a-5p triggers cell apoptosis to facilitate mycobacterial clearance through targeting JNK2 in human macrophages. *Cell Cycle.* 2016;15(18):2527-2538. doi:10.1080/15384101.2016.1215386
 45. Zhang D, Yi Z, Fu Y. Downregulation of miR-20b-5p facilitates *Mycobacterium tuberculosis* survival in RAW 264.7 macrophages via attenuating the cell apoptosis by Mcl-1 upregulation. *J Cell Biochem.* 2019;120(4):5889-5896. doi:10.1002/jcb.27874

46. Tripathi A, Srivastava V, Singh BN. hsa-let-7b-5p facilitates Mycobacterium tuberculosis survival in THP-1 human macrophages by Fas downregulation. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(7). doi:10.1093/femsle/fny040

Pies de figura

Tabla 1. Modelos en los que se ha evaluado la expresión de los miRNA inhibidores de apoptosis sobreexpresados en macrófagos por la infección con *Mtb*

Tabla 2. Características Clínicas de los individuos participantes. La prueba U de Mann-Whitney fue utilizada para identificar diferencias entre los grupos. Se muestran la mediana y rango intercuartílico (\pm) para todas las variables cuantitativas. IMC (índice de Masa Corporal), HbA1c (% Hemoglobina glicosilada), HDL (Lipoproteína de alta densidad), VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad) y LDL (Lipoproteína de baja densidad). Para las variables cualitativas que corresponden a los años diagnóstico y tratamiento farmacológico se muestra la n y porcentaje (%). *P < 0.05. NA, No aplica; Dx, diagnóstico.

Figura 1. Viabilidad de los MDM determinada por citometría de flujo (MDM viables: negativos a LIVE / DEAD Fixable Violet). Se realizó una prueba Kruskal-Wallis para identificar diferencias entre las cuatro condiciones de estudio. Se muestra la mediana y rango intercuartílico. B, Basal; Rv, H37Rv. Cada símbolo corresponde a un individuo.

Figura 2. Expresión relativa de U6 en las 34 muestras de cDNA (10 No DM2 Basal, 10 No DM2 H37Rv, 7 DM2 Basal y 7 No DM2 H37Rv). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. *P < 0.05. Se muestra la mediana y rango intercuartílico. B, Basal; Rv, H37Rv. Cada símbolo corresponde a un individuo.

Figura 3. Expresión relativa de miRNA inhibidores de apoptosis en MDMs. Los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las cuatro condiciones se compararon con la prueba de Kruskal-Wallis para (A) let-7b-5p, (B) let-7b-5p, (C) miR-29a-5p, (D) miR-21-5p, (E) miR-582-5p, (F) miR-223-3p, (G) miR-20a-5p, (H) miR-20a-5p, (I) miR-155-5p. Se muestra la mediana y rango intercuartílico. B, Basal; Rv, H37Rv. Cada símbolo corresponde a un individuo.

Tablas

Tabla 1. Modelos en los que se ha evaluado la expresión de los miRNA inhibidores de apoptosis sobreexpresados en macrófagos por la infección con *Mtb*

| miRNA | Molécula blanco | Célula | Cepa | MOI | Cinética | Gen constitutivo | Regulación por <i>Mtb</i> | Referencia |
|-------------------------|------------------------|--|--|----------------|----------|----------------------|---------------------------|------------|
| miR-582-5p | FOXO1 | Monocitos -Pacientes TB activa -Individuos sanos | No se reporta (NR) | No aplica (NA) | NA | U6 | Aumenta | 40 |
| miR-155-5p | | BMM WT (ratón) | H37 Rv | 5 | 24 h | Sno202 | Aumenta | 41 |
| miR-155-5p | FOXO3 | CMSP -Pacientes TB activa -Individuos sanos | (NR) | NA | NA | U6 | Aumenta | 42 |
| miR-223-3p | FOXO3 | CMSP -Pacientes TB activa -Individuos sanos | (NR) | NA | NA | U6 | Aumenta | 23 |
| | | -MDMH -THP-1 | H37Rv | 5 | 12 h | U6 | Aumenta | |
| let-7e-5p miR-29a-3p | Caspasa-3 Caspasa-7 | MDMH -De donantes sanos Diferenciados por 3 días | <i>Mycobacterium avium hominissuis</i> | 25 | 48 h | miR-16 miR-21 miR-24 | Aumentan | 43 |

| | | | | | | | | |
|-------------------|-------|--|-----------|----|---------|----|-----------|---------------|
| miR-21-5p | Bcl-2 | RAW264.7 THP-1 | H37R v | 10 | 24 h | U6 | Aumenta | ²⁴ |
| miR-20a-5p | JNK2 | CMSP - Pacientes TB latente -Pacientes TB activa -Individuos sanos | (NR) | NA | NA | U6 | Disminuye | ⁴⁴ |
| | | THP-1 | H37R a | 10 | 8h | U6 | Disminuye | |
| miR-20b-5p | Mcl-1 | RAW264.7 | H37R v | 10 | 36 h | U6 | Disminuye | ⁴⁵ |
| let-7b-5p | Fas | THP-1 | H37R v | 10 | 24-48 h | U6 | Aumenta | ⁴⁶ |

| Tabla 2. Características Clínicas de los individuos participantes | | | |
|--|---------------------------|--|----------------|
| Variable | Individuos sin DM2 | Individuos con DM2 | Valor P |
| Total de casos | 10 | 7 | NA |
| Años de diagnóstico, n (%) | NA | 7 ± 7 0-3 años Dx= 3 (42.85%) ≥7 años Dx= 4 (57.15%) | NA |
| Sexo, hombre/mujer | 4/6 | 5/2 | NA |
| Edad (años) | 42.5 ± 10.5 | 51 ± 6 | 0.0467* |
| IMC (Kg/m²) | 24.6 ± 4.63 | 27.31 ± 1.32 | 0.1331 |
| Glucosa (mg/dL) | 82.7 ± 8.65 | 268.9 ± 103.2 | 0.0001*** |
| HbA1c (%) | 5.26 ± 0.55 | 10.77 ± 4.13 | <0.0001**** |
| Colesterol Total (mg/dL) | 157 ± 50 | 145.4 ± 106.3 | 0.9623 |
| HDL (mg/dL) | 55.2 ± 14.07 | 41.5 ± 19.5 | 0.0176* |
| VLDL (mg/dL) | 18 ± 9.5 | 30.5 ± 70 | 0.0230* |
| LDL (mg/dL) | 86 ± 47 | 114 ± 75.5 | 0.4584 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 82.4 ± 57.55 | 141 ± 145.7 | 0.022** |
| Creatinina sérica (mg/dL) | 0.8 ± 0.3 | 0.6 ± 0.1 | 0.0438* |
| Metformina + Glibenclamida, n (%) | 0 (0) | 7(100) | NA |
| Otra medicación, n (%) | 0 (0) | 4 (57) | NA |
| Hipertensión, n (%) | 0 (0) | 4 (57) | NA |

Figuras

Figura 1

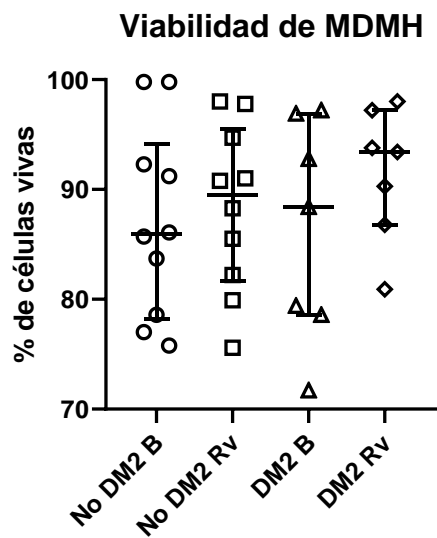


Figura 2

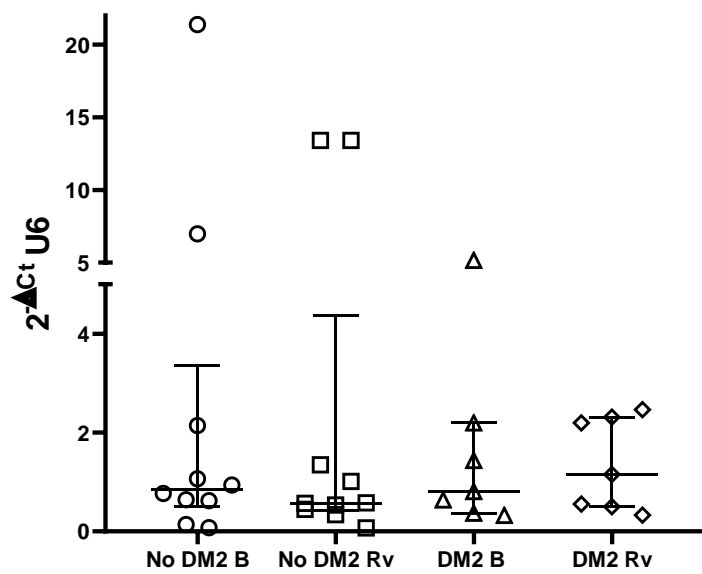
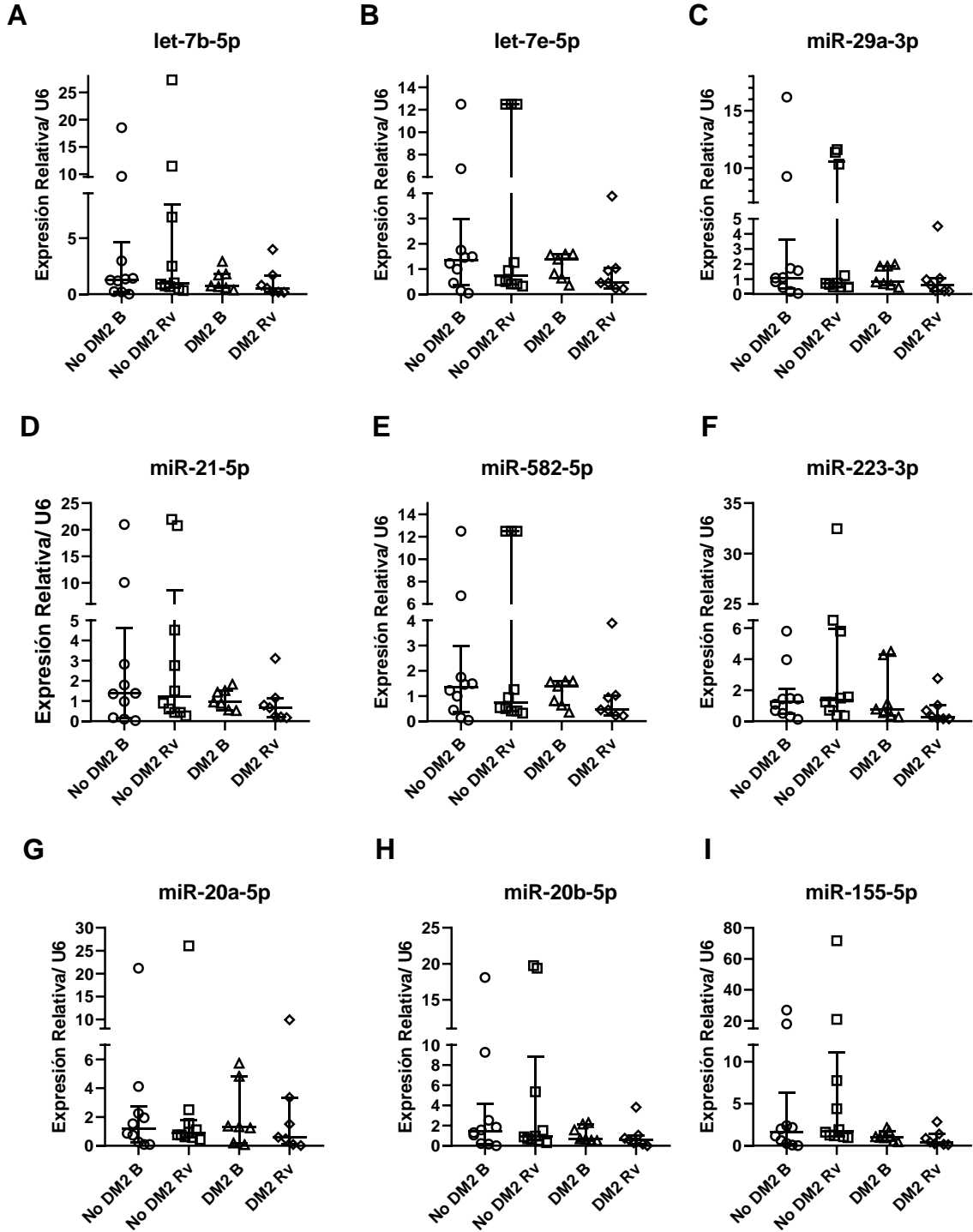


Figura 3



Diapositivas



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
 Maestría en Ciencias Biomédicas Básicas
 Facultad de Medicina

Evaluación de miRNAs inhibidores de apoptosis modulados en el macrófago durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con diabetes mellitus tipo 2

DEFENSA DE TESIS DE MAESTRÍA
 PRESENTA:
 QFB Anahí Lugo Sánchez

CO-DIRECTORES DE TESIS:
 Dra. Carmen Judith Serrano Escobedo
 Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado

ASESORA:
 Dra. Mariana Salgado Bustamante

10/05/2022

Introducción

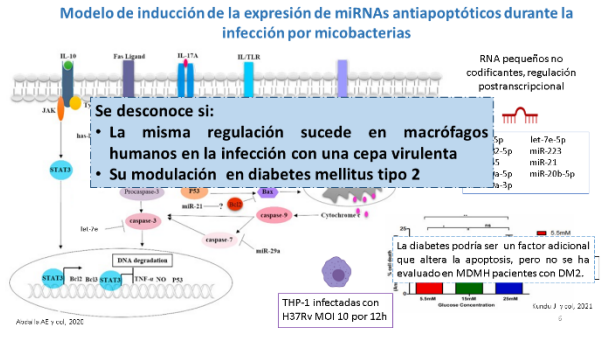
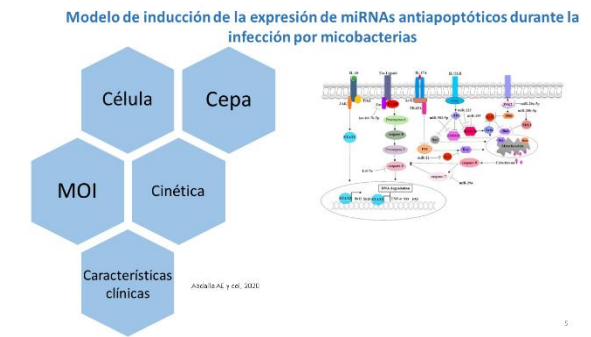
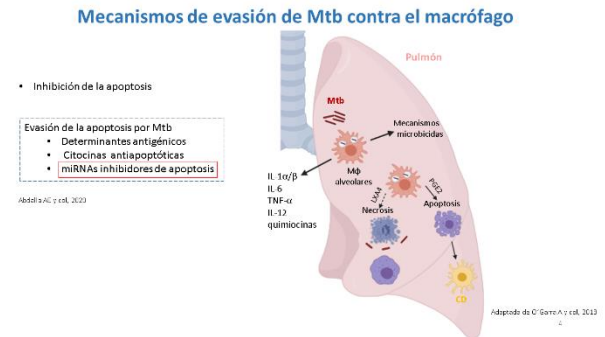
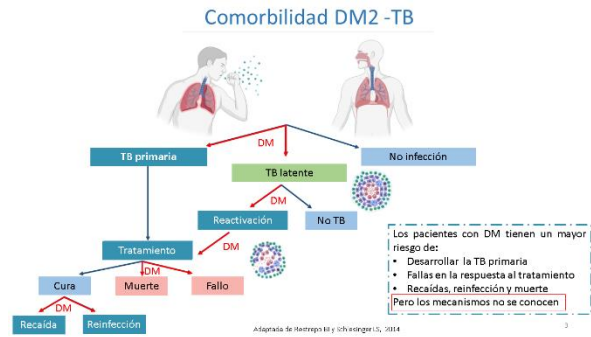
DM2
 Enfermedad metabólica crónica

Tuberculosis
 Enfermedad infecciosa crónica

Las causas y mecanismos de esta susceptibilidad a TB no se conocen por completo.

DM2 90%
 DX TB 16%
 TB-DM2

Retrepo J, 2014
 Segura-Correa CA y col, 2019



Justificación

En el macrófago la infección con micobacterias induce la expresión de miRNA inhibidores de apoptosis. No se ha estudiado en pacientes con DM2.

Las células de los pacientes con DM2 tienen propensión a apoptosis, lo que se ha asociado a los niveles de glicemia *in vitro*.

Se desconoce cómo se modula la expresión de los miRNA antiapoptóticos en:

1. Los macrófagos humanos de individuos sanos infectados *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis*
2. Los macrófagos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2
3. Los macrófagos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 infectados *in vitro* por *Mycobacterium tuberculosis*

Pregunta de investigación

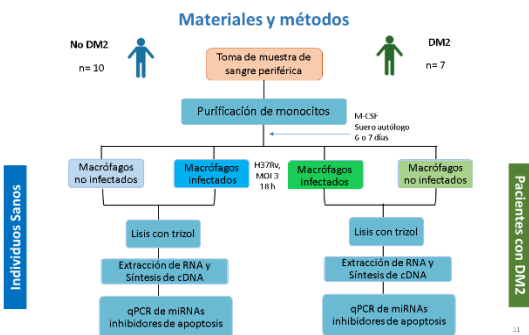
¿La diabetes mellitus tipo 2 influye en la modulación de miRNAs inhibidores de apoptosis en macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*?

Objetivo general

Evaluar la influencia de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la expresión en macrófagos de miRNAs inhibidores de apoptosis durante la infección *in vitro* por *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos específicos

- Evaluar la expresión basal de los miRNAs relacionados a la inhibición de apoptosis en MDM de pacientes con DM2.
- Evaluar la expresión de los miRNAs relacionados a la inhibición de apoptosis en MDM de pacientes con DM2 durante la infección *in vitro* con Mtb.
- Comparar la expresión de los miRNAs relacionados a la inhibición de apoptosis en MDM de individuos con y sin DM2 antes y después de la infección con Mtb.



Selección de individuos participantes

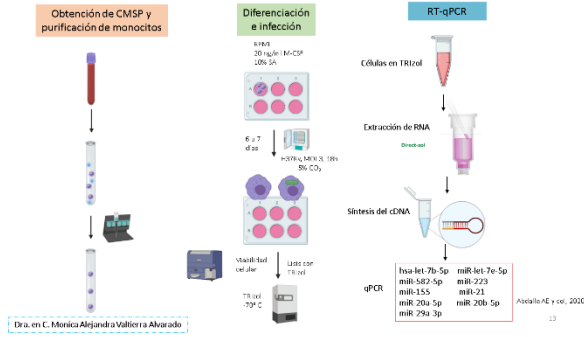
| Criterios de inclusión de individuos participantes en el estudio | | |
|---|--|--|
| Criterio | Individuos sin DM2 | Individuos con DM2 |
| DM2 | Sin DM2 | Diagnóstico de acuerdo con criterios de la ADA |
| Sexo | Hombre o mujer | Hombre o mujer |
| Edad | 30-60 años | 30-60 años |
| HbA1c | <5.7% | > 9% |
| Síndrome metabólico | No tener (criterios de la NCEP- ATP III) | No Aplica |
| Carta de consentimiento | Firmada | Firmada |
| *ADA: Asociación Americana de Diabetes | | |
| *NCEP- ATP III: Panel para el Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación en Colesterol | | |

| Criterios de no inclusión de individuos participantes en el estudio | | |
|--|--|--|
| • Complicaciones asociadas derivadas de la DM2 (retinopatía avanzada, nefropatía y/o neuropatía) | | |
| • IMC mayor a 35 | | |
| • Cursar enfermedades infecciosas en la toma de muestra | | |
| • Terapia con insulina | | |
| • Enfermedades autoinmunes | | |
| • Terapia inmunosupresora | | |
| • VIH positivo por cuantitativo | | |
| • Tabaquismo positivo | | |
| • Alcoholismo positivo | | |

| |
|--|
| IMSS Hospital General de Zona No. 1 - Dr. Emilio Varela Luján ISSSTE Hospital General Zacatecas |
|--|

| |
|---|
| Proyecto registrado y aprobado por la Comisión Nacional Científica del IMSS, misma que tiene un Comité de Ética. Bajo el número de registro R-2021-795-002. |
|---|

| |
|--|
| MPSS Fátima Dueñas Arteaga Dra. en C. Monica Alejandra Valtierra Alvarado |
|--|



Síntesis de cDNA de las muestras de RNA total

Cuarto Blanco

| Reactivo mezcla 1 | Vol. (µl) |
|-----------------------|-----------|
| UNI TP's 10 mM | 1 |
| Oligo de Chen 60µM | 1 |
| Reverse U6 10µM | 1 |
| H ₂ O DEPC | 5 |

| Reactivo mezcla 2 | Vol. (µl) |
|---------------------------------|-----------|
| Buffer 10X | 7 |
| Reverse Transcriptasa (200U/µl) | 1 |
| H ₂ O DEPC | 7 |

Tubo con 2µl de RNA a 45ng/µl

Terciocontador Gene Amp PCR System 9700

| Etapa | Temperatura [°C] | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|------------------|--------|-------------|
| Hibridación | 60 | 5 min | 1 |
| Polinimerización del cDNA | 25 | 10 min | 1 |
| Inactivación enzimática | 42 | 60 min | 1 |
| | 65 | 20 min | 1 |

Cuantificar, ajustar la concentración a 45ng/µl y almacenar el producto de la reacción RT (cDNA) -20°C.



Concentraciones de reactivos y programa de ciclos para la qPCR

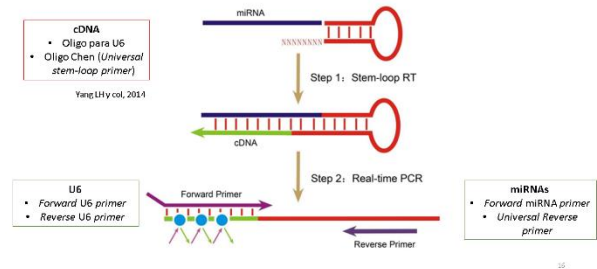
| Reactivo master mix | Concentración stock | Concentración final en la reacción | Volumen (µl) |
|----------------------------------|---------------------|------------------------------------|--------------|
| SioFast Eva green PCR Master Mix | 2x | 1x | 5 |
| Forward primer US o miRNA | 1µM | 0.1µM | 1 |
| Reverse primer US o universal | 1µM | 0.1µM | 1 |
| H ₂ O DEPC | — | — | 1 |
| cDNA | 45ng/µl | 9ng/µl | 2 |

| Etapa | Temperatura [°C] | Tiempo | # de ciclos |
|-----------------------|------------------|--------|-------------|
| Activación enzimática | 95 | 3 min | 1 |
| Destnaturalización | 95 | 5 seg | |
| Hibridación/Extensión | 62 | 36 seg | 40 |
| Curva Melting | 65-95 | 30 seg | 1 |
| Enfriado | 37 | 30 seg | 1 |

Temperatura de alineamiento 50°C para miR-29a-3p

Light Cycler 480 Roche

Oligos



Análisis Estadístico

Expresión relativa

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Control endógeno snRNA US

Características clínicas

U de Mann-Whitney

Niveles de expresión de miRNAs se compararon entre los 4 grupos: Kruskal-Wallis

*P < 0.05

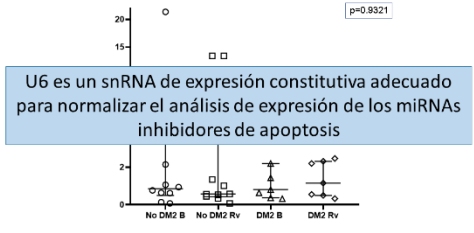
Diseño del estudio: Estudio tipo experimental, transversal y analítico



Tabla 2. Características Clínicas de los individuos participantes

| Variable | Individuos sin DM2 | Individuos con DM2 | Valor P |
|----------------------------------|--------------------|---|-------------|
| Total de casos | 10 | 7 | NA |
| Años de diagnóstico, n (%) | NA | 7 / 7 0-3 años Dx: 3 (42.85%) ≥ 7 años Dx: 4 (57.15%) | NA |
| Sexo, hombre/mujer | 4/6 | 5/2 | NA |
| Edad (años) | 42.5 ± 10.5 | 51 ± 6 | 0.0467* |
| IMC (kg/m ²) | 24.6 ± 4.63 | 27.31 ± 1.32 | 0.1331 |
| Glucosa (mg/dl) | 82.7 ± 8.65 | 268.9 ± 103.2 | 0.0001*** |
| HbA1c (%) | 5.26 ± 0.55 | 10.77 ± 4.13 | <0.0001**** |
| Colesterol Total (mg/dl) | 157 ± 50 | 145.4 ± 106.3 | 0.9623 |
| HDL (mg/dl) | 55.7 ± 14.07 | 41.5 ± 19.5 | 0.0176* |
| VLDL (mg/dl) | 18 ± 9.5 | 30.5 ± 70 | 0.0250* |
| LDL (mg/dl) | 86 ± 47 | 114 ± 75.5 | 0.4584 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 80.4 ± 57.55 | 141 ± 145.7 | 0.022** |
| Creatinina sérica (mg/dl) | 0.8 ± 0.3 | 0.6 ± 0.1 | 0.0438* |
| Metformina + Glibenclámda, n (%) | 0 (0) | 7 (100) | NA |
| Otra medicación, n (%) | 0 (0) | 4 (57) | NA |
| Hipertensión, n (%) | 0 (0) | 4 (57) | NA |

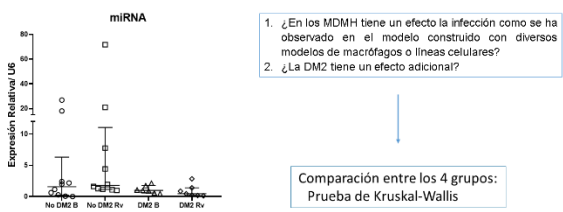
Evaluación U6 en MDMH como un snRNA para la normalización



U6 es un snRNA de expresión constitutiva adecuado para normalizar el análisis de expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis

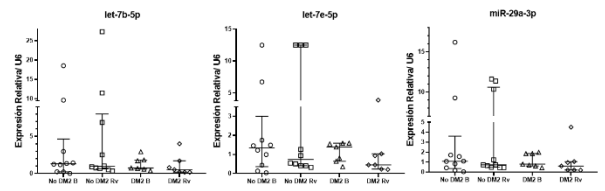
Se realizó la prueba t-student. Se muestran la mediana y rango intercuartílico. (20)

Análisis de la expresión relativa



21

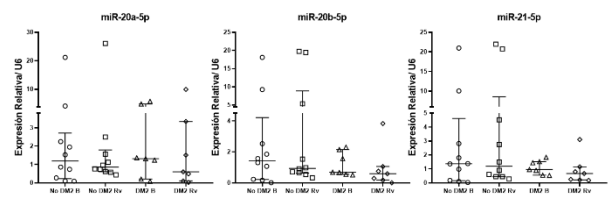
Expresión relativa de los miRNAs inhibidores de apoptosis en MDMH



Se realizó la prueba t-student. Se muestran la mediana y rango intercuartílico. (21)

22

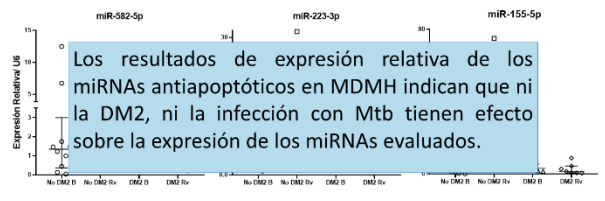
Expresión relativa de los miRNAs inhibidores de apoptosis en MDMH



Se realizó la prueba t-student. Se muestran la mediana y rango intercuartílico. (22)

23

Expresión relativa de los miRNAs inhibidores de apoptosis en MDMH



Se realizó la prueba t-student. Se muestran la mediana y rango intercuartílico. (23)

24



Hipótesis

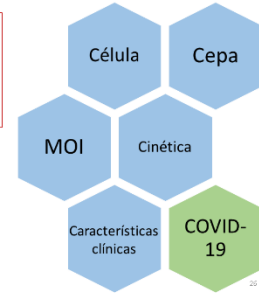
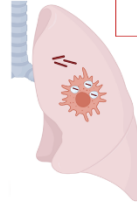
Los niveles de expresión de los miRNAs inhibidores de apoptosis modulados durante la infección *in vitro* con *Mtb* en los MDM de pacientes con DM2 son menores respecto a la expresión en individuos sin diabetes.

25

Modelos en los que se ha evaluado expresión de los miRNA inhibidores de apoptosis sobreexpresados en macrófagos por la infección con *Mtb*

Evaluamos tanto el efecto de la DM2, como el de la infección por *Mtb* MDMH en la expresión de los miRNA antiapoptóticos
Modelo de infección temprana
 H37Rv
 MOI de 3
 18 hr

Logo Lopez N y col., 2018
 PMID: 29513874

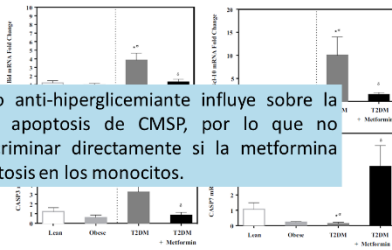


26

La metformina inhibe el efecto de la DM2 en la expresión de mRNA de proteínas proapoptóticas y caspasas en CMSP

Características clínicas

| Grupo | Hb1Ac (%) |
|------------------|-----------|
| DM2 | 8.7 ±0.35 |
| DM2 + metformina | 8.0 ±0.62 |

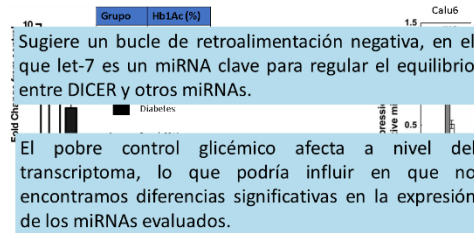


El tratamiento anti-hiperglicémico influye sobre la propensión a apoptosis de CMSP, por lo que no podemos discriminar directamente si la metformina afecta la apoptosis en los monocitos.

Al-Dubeni M y col., 2021

27

Efecto de la DM2 en la expresión de miRNA y sus blancos

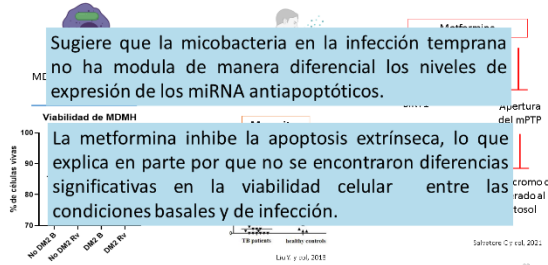


Sugiere un bucle de retroalimentación negativa, en el que let-7 es un miRNA clave para regular el equilibrio entre DICER y otros miRNAs.

El pobre control glicémico afecta a nivel del transcriptoma, lo que podría influir en que no encontramos diferencias significativas en la expresión de los miRNAs evaluados.

28

Efecto de la TB activa y la metformina en la viabilidad celular



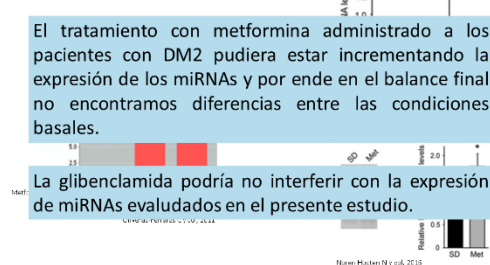
Sugiere que la micobacteria en la infección temprana no ha modula de manera diferencial los niveles de expresión de los miRNA antiapoptóticos.

La metformina inhibe la apoptosis extrínseca, lo que explica en parte por que no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre las condiciones basales y de infección.

Saltatore C y col., 2021

29

Efecto de la metformina en la expresión de miRNA y sus blancos



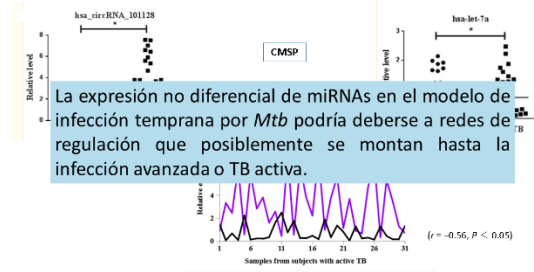
El tratamiento con metformina administrado a los pacientes con DM2 pudiera estar incrementando la expresión de los miRNAs y por ende en el balance final no encontramos diferencias entre las condiciones basales.

La glibenclamida podría no interferir con la expresión de miRNAs evaluados en el presente estudio.

Naranjo-Holten M y col., 2018

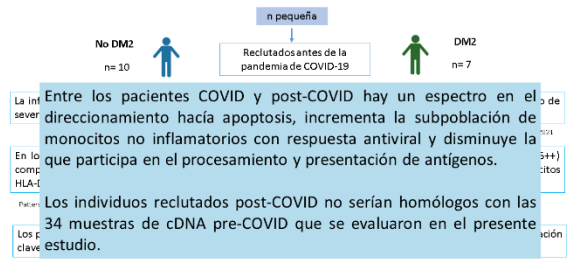
30

Efecto de la metformina en la TB activa expresión de circRNA y sus miRNA blancos



31

COVID-19



Alvarado y cols, 2022

32

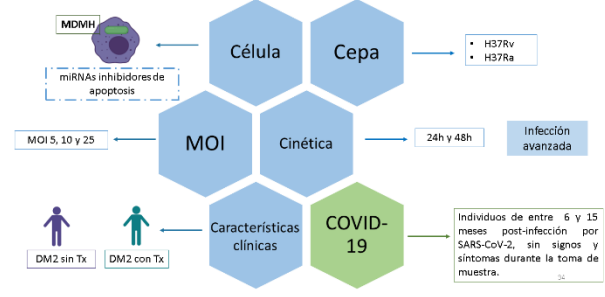
Conclusiones

Los resultados de este estudio en MDMH sugieren que la evasión de la apoptosis mediada por miRNAs en macrófagos infectados con *Mtb* no se da o no se comienza a gestar de manera diferencial por influencia de la DM2 durante la infección temprana con una cepa virulenta de *Mtb* (H37Rv) a MOI baja.

Comportamiento en MDMH provenientes de pacientes con DM2

33

Perspectivas



34



35