

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN MACRÓFAGOS
INFECTADOS *in vitro* POR *Nocardia brasiliensis***

Por:

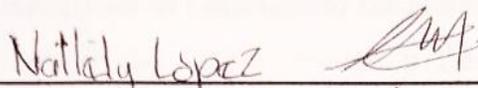
Q.C.B OSCAR DANIEL CASTILLO GÁLVEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

Agosto 2025

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN MACRÓFAGOS
INFECTADOS *in vitro* POR *Nocardia brasiliensis***

Aprobación de Tesis:



DRA. C. NALLELY LÓPEZ LÓPEZ

Director



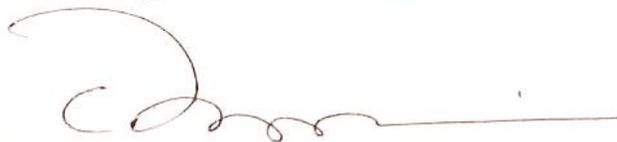
DR. C. ADRIAN GEOVANNI ROSAS TARACO

Codirector



DRA. C. NOE MACÍAS SEGURA

Miembro de la Comisión



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

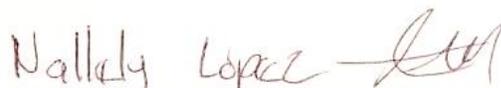
**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN
MACRÓFAGOS INFECTADOS *in vitro* POR
*Nocardia brasiliensis***

Presentado por:

Q.C.B Oscar Daniel Castillo Gálvez

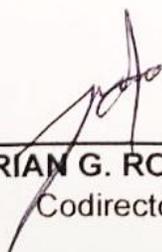
Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología y en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento y Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Nallely López López y la co-dirección del Dr. C. Adrián Giovanni Rosas Taraco.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: **IN23-00008**



DRA. C. NALLELY LÓPEZ LÓPEZ

Director de Tesis



DR. C. ADRIÁN G. ROSAS TARACO

Codirector



DR. C. NOE MACÍAS SEGURA

Miembro de la Comisión

DEDICATORIA

A los que les interesa la ciencia, porque, aunque es un camino difícil lleno de obstáculos, nunca deja de ser un camino lleno de sorpresas y de aprendizaje.

Dedico esta tesis:

A mis padres

Jesús Castillo Pérez y Fátima Gálvez Cruz

Por apoyarme a su manera y darme siempre las ganas de seguir adelante

A mi hermano

Antonio de Jesús Castillo Gálvez

Por incentivar me desde pequeño la curiosidad que me ha llevado hasta aquí

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres**, por ser el soporte que nunca me fallaba y que sin ellos no hubiera podido llegar a ser el hombre que soy ahora

A **mi hermano**, por ser una compañía ayer, hoy y siempre, en la que puedo confiar y no me fallará.

A **mi familia**, por ese cariño inigualable que siempre me dieron sin importar la distancia que existiera.

A la **Dra. Nallely López**, mi directora de tesis, por acompañarme en este proceso de mutuo aprendizaje y apoyarme no solo en lo académico si no también en lo personal.

Al **Dr. Adrián Rosas**, mi co-director de tesis, por ayudarme a aprender y a desarrollar mi aprendizaje y demostrarme lo mucho que puedo lograr.

Al **Dr. Noe Macías**, miembro de mi comisión de tesis, por ser siempre accesible a las dudas y necesidades que ocupe durante mi maestría.

A **mis compañeros del departamento**, Edgar, Luis Carlos, Luisa, Emilio, Tomas, Oliver, por ser parte de las risas y de las dudas de la maestría.

A **mis compañeros de generación**, Juan de Dios, Itzel, Yare, Sergio y Joce, por nunca perder el contacto y siempre estar apoyándonos.

A **los químicos del departamento**, Azalia, Uriel, Ayllen y Chio, por ser tan accesibles en las necesidades del trabajo y ser un buen apoyo de amistad.

A **mis amigos** Joel, Fabi, Andrés, Julio, Jocelyn y Yannay, por estar apoyándome y quererme a pesar de vernos en pocas ocasiones.

Al **departamento de inmunología** por ofrecerme un lugar donde seguir desarrollándome como humano y como científico.

Por último, agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT)** por la beca otorgada durante dos años de estudio en el programa de Maestría en Ciencias (CVU/Becario: 1313865)

| | |
|--|------------|
| Contenido | |
| Lista de figuras | IX |
| Lista de tablas | XI |
| Lista de abreviaturas | XII |
| CAPÍTULO I | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Micetoma | 1 |
| 1.2 Actinomicetoma | 3 |
| 1.3 <i>Nocardia brasiliensis</i> | 4 |
| 1.4 Respuesta inmune ante infección con <i>N. brasiliensis</i> | 5 |
| 1.5 Funciones de los macrófagos | 6 |
| 1.6 miRNAs | 8 |
| CAPÍTULO II | 12 |
| ANTECEDENTES | 12 |
| 2.1 Participación de los miRNAs en infecciones con micobacterias | 12 |
| 2.2 Infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> en macrófagos | 14 |
| CAPÍTULO III | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 16 |
| CAPÍTULO IV | 17 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| CAPÍTULO V | 18 |
| OBJETIVOS | 18 |
| 5.1 Objetivo general..... | 18 |
| 5.2 Objetivos específicos | 18 |
| CAPÍTULO VI | 19 |

| | |
|---|-----------|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 6.1 Obtención de muestra sanguínea..... | 19 |
| 6.2 Purificación de monocitos con selección negativa..... | 19 |
| 6.3 Análisis de pureza y viabilidad de los macrófagos | 20 |
| 6.4 Cepa bacteriana de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 20 |
| 6.5 Preparación del inóculo de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 20 |
| 6.6 Infección con <i>N. brasiliensis</i> | 21 |
| 6.7 Confirmación de la infección..... | 21 |
| 6.8 Extracción de RNA | 22 |
| 6.9 Síntesis de cDNA..... | 22 |
| 6.10 Expresión de miRNAs por qPCR..... | 23 |
| 6.11 Análisis <i>in silico</i> | 24 |
| 6.12 Análisis estadístico | 24 |
| 6.13 Estrategia general..... | 25 |
| CAPÍTULO VII | 26 |
| RESULTADOS | 26 |
| 7.1 Reclutamiento de donadores..... | 26 |
| 7.2 Diferenciación de monocitos a macrófagos | 27 |
| 7.3 Preparación de la cepa de <i>N. brasiliensis</i> | 29 |
| 7.4 Infección de MDMs con <i>N. brasiliensis</i> | 29 |
| 7.5 Análisis de la expresión génica de los miRNAs en macrófagos infectados | 32 |
| 7.6 Análisis <i>in silico</i> de bases de datos de genes diana de miRNAs..... | 32 |
| 7.7 Análisis <i>in silico</i> de bases de datos transcripcionales de macrófagos infectados con micobacterias | 36 |
| CAPÍTULO VIII | 38 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| DISCUSIÓN | 38 |
| CAPÍTULO IX | 47 |
| CONCLUSIÓN | 47 |
| CAPÍTULO X | 48 |
| PERSPECTIVAS | 48 |
| CAPÍTULO XI | 49 |
| LIMITANTES | 49 |
| CAPÍTULO XII | 50 |
| BIBLIOGRAFÍA | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotografía de una lesión cutánea, subcutánea y una ilustración de una lesión ósea en extremidad inferior provocada por el micetoma. | 1 |
| Figura 2. Número de casos de micetoma en el mundo. | 2 |
| Figura 3. Distribución de casos de micetoma reportados en México. | 3 |
| Figura 4. <i>Nocardia brasiliensis</i> en: A) Agar sangre, B) Tinción de Kinyoun y C) Tinción de Gram. | 4 |
| Figura 5. Biogénesis de los miRNAs. | 9 |
| Figura 6. Funciones alternativas de los miRNAs. | 10 |
| Figura 7 Genes que regulan los miRNAs en infección con micobacterias. | 14 |
| Figura 8. Esquema de la estrategia general. | 25 |
| Figura 9. Imágenes representativas de 0.1×10^6 células en cultivo con medio RPMI 1640 completo en placa de 6 pocillos a 37°C 5% CO_2 | 27 |
| Figura 10. Imágenes representativas de 0.1×10^6 monocitos cultivados en placa de 6 pocillos con medio RPMI 1640 completo a 37°C 5% CO_2 | 28 |
| Figura 11. Estrategia de gating del análisis por citometría de flujo. | 28 |
| Figura 12. Porcentaje de células CD14+ y de viabilidad de monocitos y MDMs evaluados por citómetro de flujo LSRFortessa. | 29 |
| Figura 13. Cambio en el tamaño del citoplasma de los macrófagos sin infección contra macrófagos infectados 2 horas y 20 horas. | 30 |
| Figura 14. Imagen representativa de los macrófagos infectados por <i>N. brasiliensis</i> durante 2 horas a una MOI de 10. | 31 |
| Figura 15. Análisis de la expresión relativa de miRNAs en macrófagos infectados con <i>N. brasiliensis</i> por 2 horas a un MOI de 10. | 32 |
| Figura 16. Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados predichos por miR-21, empleando el software STRING. | 33 |
| Figura 17. Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados predichos por miR-26b, empleando el software STRING. | 34 |
| Figura 18. Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados predichos por miR-29c, empleando el software STRING. | 35 |

Figura 19 Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados validados experimentalmente por miR-21, miR-26b y miR-29c. 36

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Lista de miRNAs que modulan la respuesta inflamatoria después de la infección con M. tuberculosis. | 12 |
| Tabla 2 Criterios para el reclutamiento de donadores clínicamente sanos | 19 |
| Tabla 3 Composición del master mix para la síntesis de cDNA | 22 |
| Tabla 4 Composición del master mix para la qPCR | 23 |
| Tabla 5. Resultados de la biometría hemática de los donadores. | 26 |
| Tabla 6. Vías de señalización relacionadas con la respuesta inmune con cambios en el enriquecimiento funcional por infección con M. tuberculosis. | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ACSL | Del inglés “Acyl-CoA synthetase long chain family member” |
| ARNm | ARN mensajero |
| ATCC | Del inglés “American Type Culture Collection” |
| BCG | Bacilo Calmette y Guérin |
| CCL | Del inglés “Chemokine (C-C motif) ligand” |
| cDNA | ADN complementario |
| CD | Cúmulos de diferenciación |
| CDS | Del inglés “Coding Sequence” |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DC | Del inglés “Dendritic cell” |
| DNA | Del inglés “Deoxyribonucleic acid” |
| EDTA | Del inglés “Ethylenediaminetetraacetic acid” |
| ERK | Del inglés “Extracellular signal-regulated kinases” |
| FASLG | Fas ligando |
| FoxO | Del inglés “Forkhead box O” |
| GM-CSF | Del inglés “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” |
| HUJEG-1 | <i>Nocardia brasiliensis</i> |
| IFN | Interferón |
| IL | Interleucina |
| IRF | Del inglés “Interferon Regulatory Factor” |

| | |
|----------------|---|
| LPS | Lipopolisacáridos |
| M1 | Macrófago activado clásico |
| M2 | Macrófago activado alternativo |
| M-CSF | Del inglés “Macrophage colony-stimulating factor” |
| MAPK | Del inglés “Mitogen-activated protein kinases” |
| MCE | Del inglés “Mammalian cell entry” |
| MDM | Macrófago derivado de monocito |
| MOI | Del inglés “Multiplicity of infection” |
| miRNA | MicroARN |
| mL | Mililitro |
| NF- κ B | Del inglés “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells” |
| PBMC | Del inglés “Peripheral Blood Mononuclear Cells” |
| PDCD | Del inglés “Programmed cell death protein” |
| PPAR | Del inglés “Peroxisome proliferator-activated receptor” |
| PRKCD | Del inglés “Protein kinase C delta type” |
| PTEN | Del inglés “Phosphatase and tensin homolog” |
| RNA | Del inglés “Ribonucleic acid” |
| RPMI | Del inglés “Roswell Park Memorial Institute” |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RNS | Del inglés “Reactive Nitrogen Species” |
| ROS | Del inglés “Reactive Oxygen Species” |

| | |
|--------------|---|
| RT-qPCR | Del inglés “Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction” |
| STAT | Del inglés “Signal transducer and activator of transcription” |
| TIMP | Del inglés “Tissue inhibitor of metalloproteinases” |
| Th1 | Linfocito T cooperador 1 |
| Th2 | Linfocito T cooperador 2 |
| TNF | Del inglés “Tumor necrosis factor” |
| TNFRSF1A | Del inglés “TNF receptor superfamily member 1A” |
| TGF- β | Del inglés “Transforming Growth Factor Beta” |
| TRAF | Del inglés “TNF receptor-associated factor” |
| UTR | Del inglés “Untranslated región” |

RESUMEN

Q. C. B. Oscar Daniel Castillo Gálvez

Fecha de titulación:

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Título del estudio: Evaluación de la expresión de miRNAs en macrófagos infectados *in vitro* por *Nocardia brasiliensis*

Número de páginas: 81

Candidato para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Área de estudio: Inmunología

El actinomicetoma es una enfermedad infecciosa crónica causada por *N. brasiliensis*, un patógeno intracelular que pertenece al orden de los Mycobacteriales. Bacterias como *M. tuberculosis* pueden modular y evadir la respuesta inmune del huésped. Uno de los mecanismos de regulación es la alteración de la expresión de los microRNAs (miRNAs), lo que modifica la expresión de genes involucrados con la respuesta inmune.

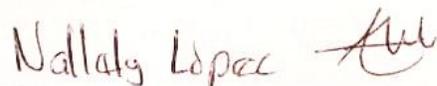
Los miRNAs son RNA no codificantes pequeños que participan en la regulación postranscripcional de diversos procesos biológicos del huésped; como la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares. Existen estudios sobre la relevancia de la expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c en infecciones con micobacterias; sin embargo, en infecciones intracelulares con *N. brasiliensis* la información es nula.

En este trabajo se realizaron infecciones con *N. brasiliensis* en macrófagos derivados de monocitos humanos, donde se analizó la expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c, además de un análisis *in silico* de bases de datos de genes diana regulados por estos miRNAs y su posible efecto en la regulación de la respuesta inmune.

Los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* mostraron un aumento de la expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c en comparación con los no infectados ($p=0.0164$, 0.0325 , 0.0279 respectivamente). Este incremento sugiere la participación de estos miRNAs en la regulación de vías de señalización como de PI3K/Akt, MAPK, p53, y en procesos como el metabolismo de ácidos grasos y la reorganización de la matriz extracelular asociado con la formación del micetoma. La alteración de estas vías puede contribuir a una disminución en la actividad microbicida y la polarización de los macrófagos durante un proceso de infección intracelular.

Entre los genes de relevancia regulados por cada miRNA se identificaron: CCL20, CCL1, FASLG y STAT3 para miR-21, relacionados con múltiples procesos inflamatorios; PRKCD y PTEN para miR-26b, asociados a la regulación de la apoptosis; y TNFRSF1A y TRAF4 para miR-29c los cuales están vinculados con TNF, que participa en los procesos de respuesta inflamatoria en infección con *M. tuberculosis*.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dra. C. Nallely López López

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Micetoma

El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica, desatendida que suele originarse en el pie, aunque puede afectar a cualquier parte del cuerpo. La enfermedad se adquiere, probablemente, por la inoculación traumática de determinados hongos o bacterias en el tejido subcutáneo¹.

El micetoma se caracteriza por la presencia de una masa subcutánea indolora con múltiples fístulas y exudado que contiene granos, en cuyo interior se encuentra el agente causal. Generalmente se extiende y afecta a la piel, las estructuras profundas y el hueso, con la consiguiente destrucción, deformidad y deterioro de la capacidad funcional, que puede ser mortal, figura 1.



Distintos tipos de lesión por micetoma

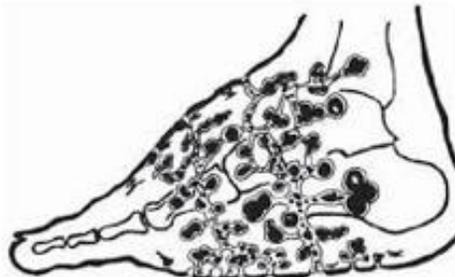


Figura 1. Fotografía de una lesión cutánea, subcutánea y una ilustración de una lesión ósea en extremidad inferior provocada por el micetoma.

La clasificación de esta enfermedad depende del agente causal: si es de origen fúngico se denomina *eumicetoma*, mientras que si es de origen bacteriano se conoce como *actinomicetoma*. En la actualidad se han identificado más de 70 bacterias y hongos diferentes como agentes etiológicos. ²

Los agentes etiológicos del micetoma se encuentran distribuidos a nivel mundial, pero son endémicos en las zonas tropicales y subtropicales de la región llamada “cinturón del micetoma” que abarca principalmente América Latina y África, siendo los países de Sudán y México los que presentan el mayor número de casos notificados, figura 2.³

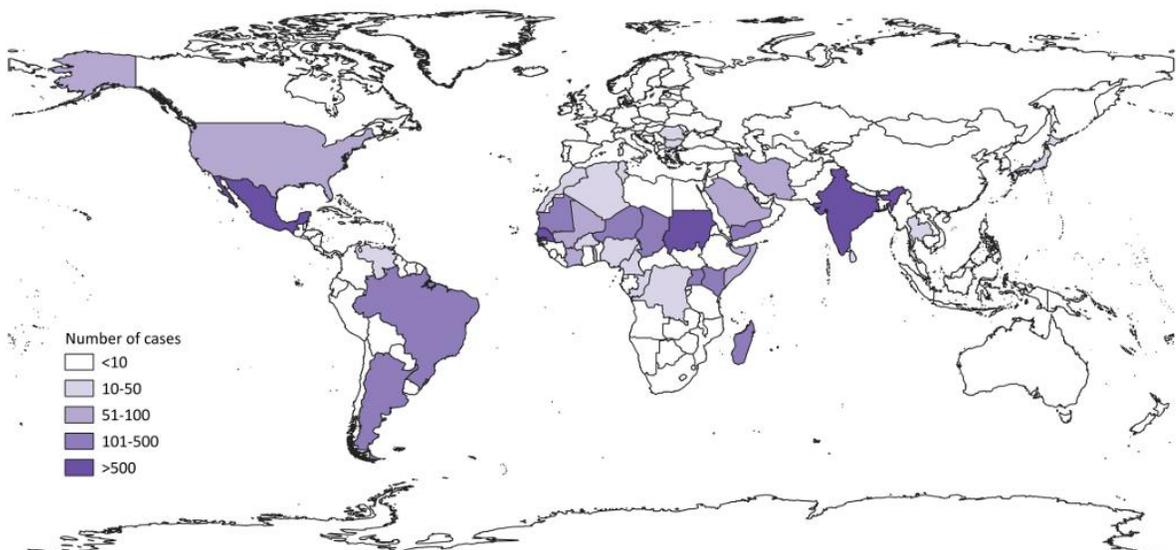


Figura 2. Número de casos de micetoma en el mundo.

México es el país latinoamericano con mayor número de casos nuevos reportados, registrando hasta 72 casos nuevos al año, aunque puede ser un número mayor, porque muchos casos no son diagnosticados hasta fases muy avanzadas de la enfermedad, figura 3. La mayoría de los casos se presentan en zonas rurales, siendo los campesinos los principales afectados. Del total de casos, el 75.69% afecta a personas de entre 16 y 50 años, el 60.29% de los casos se observaron en extremidades inferiores. De estos casos, el 96.52% de casos

de micetoma fue de actinomicetoma y el 65.58% de ellos el agente causal es *Nocardia brasiliensis*.⁴

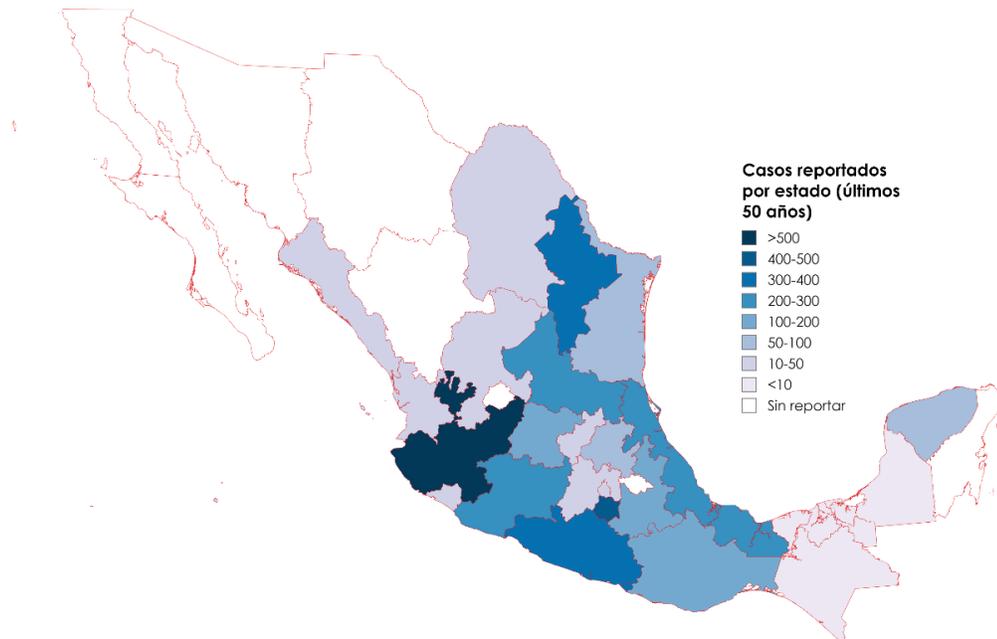


Figura 3. Distribución de casos de micetoma reportados en México.

1.2 Actinomicetoma

El actinomicetoma provocado por *N. brasiliensis* es una enfermedad infecciosa crónica, en la cual está respondiendo el sistema inmune a esta lesión generada. Desde el punto de vista histológico, la lesión presenta tres capas bien definidas: Una capa interna de células neutrofílicas que rodean el grano, una capa intermedia compuesta principalmente por macrófagos y una capa periférica constituida por linfocitos y células plasmáticas. A nivel tisular y en los ganglios linfáticos regionales se observa un perfil de citocinas donde predominan IL-10 e IL-4, lo que sugiere una respuesta inmune de tipo Th2.⁵

1.3 *Nocardia brasiliensis*

N. brasiliensis es un bacilo gram positivo, parcialmente ácido alcohol resistente, ramificado y aerobio, figura 4. Es inmóvil, no capsulado y no esporulado. Presenta un micelio aéreo característico⁶. Se encuentra presente en el suelo, materia orgánica y en cuerpos acuáticos. Pertenece al orden de los Mycobacteriales, al cual también pertenecen otros patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*.⁷

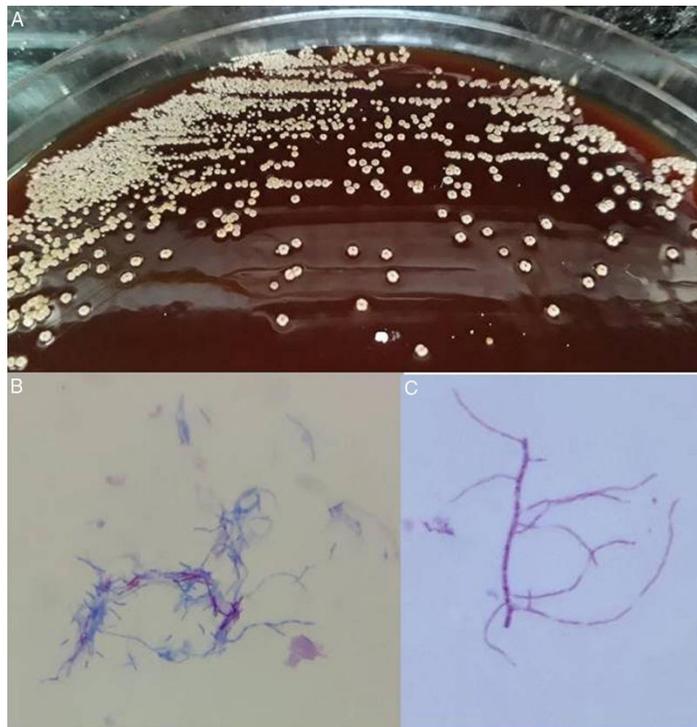


Figura 4. *Nocardia brasiliensis* en: A) Agar sangre, B) Tinción de Kinyoun y C) Tinción de Gram.

Al ser una bacteria saprofita, se encuentra naturalmente en el suelo y el agua, y puede ingresar al hospedero a través de lesiones causadas por espinas o astillas, afectando principalmente las extremidades inferiores. Una vez dentro del organismo, se activa la respuesta inmune innata que, en condiciones normales, eliminaría la bacteria. Sin embargo, *N. brasiliensis* ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune a través de distintos factores de virulencia, como la producción de catalasa, la superóxido dismutasa y componentes de su pared celular, donde destaca el factor cuerda, el cual se compone de ácidos micólicos

que impiden la fusión fagosoma-lisosoma y además de un bloqueo de acidificación del mismo.⁸ También se han identificado genes que codifican fosfolipasa C, proteasas y proteínas de entrada celular en mamíferos (MCE), las cuales facilitan la entrada a las células, además de producir compuestos inmunosupresores y citotóxicos^{9,10}. Esta evasión inmunológica favorece la formación de la lesión granulomatosa característica, ya que la bacteria logra sobrevivir dentro de células fagocíticas como los neutrófilos y los macrófagos en el sitio de infección.

1.4 Respuesta inmune ante infección con *N. brasiliensis*

Se ha estudiado la respuesta inmune del huésped ante la infección por *N. brasiliensis*, la cual inicia por la respuesta inmune innata y activación de la respuesta inflamatoria para ayudar a destruir el patógeno.⁸

De manera general, en la respuesta inflamatoria aguda ocurren cambios vasculares, producción de moléculas como TNF, IFN- γ , IL-1, IL-6 e IL-8, y cambios celulares como quimiotaxis, fagocitosis y destrucción intracelular del patógeno mediante ROS y RNS¹¹. Sin embargo, la presencia de un proceso inflamatorio durante semanas, meses o años en el mismo tejido u órgano genera alteraciones en su estructura y apariencia, lo que puede llevar a su destrucción y a la pérdida de función. La respuesta del huésped también contribuye con una intensa inflamación delimitada por fibras de tejido conectivo, formando granulomas que contienen fibroblastos, linfocitos, células espumosas, células dendríticas y fagocitos. Además, si la infección no se resuelve y el agente causal persiste, la respuesta exacerbada del huésped puede mantenerse durante meses o incluso años, destruyendo los tejidos y órganos¹².

La inmunidad innata puede limitar el crecimiento bacteriano, pero para lograr la eliminación se requiere la participación de la rama adaptativa, principalmente una respuesta de Th1, específicamente por una producción de IFN- γ para la eliminación correcta de la bacteria¹³. Los fagocitos, principalmente los macrófagos, al ser estimulados por IFN- γ , ejercen una mejor actividad

microbicida y un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias amplificando la respuesta inmune y creando un proceso de retroalimentación positiva.

Sin embargo, en ocasiones, la respuesta resulta deficiente debido a que los macrófagos infectados sin el estímulo del IFN- γ , no logran eliminar la bacteria y pueden actuar como células huésped, proporcionando un ambiente favorable para la bacteria¹⁴. Por otra parte, cuando respuesta adaptativa sucede principalmente por células Th2, lleva a un ambiente antiinflamatorio donde predominan citocinas como IL-10 e IL-4¹⁵, esto provoca a que no se lleve una correcta eliminación del patógeno.

1.5 Funciones de los macrófagos

Los monocitos son células hematopoyéticas de la línea mieloide, que circulan en la sangre y migran continuamente a los tejidos donde se diferencian a macrófagos. Pertenecen al sistema fagocítico mononuclear, miden entre 10 y 15 μm y poseen núcleos en forma de riñón, así como un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos del citoesqueleto lo que permite su principal función de fagocitosis. Los monocitos son células heterogéneas, clasificados en diferentes subgrupos distinguibles en base a la expresión de distintos marcadores de superficie y en base a sus funciones específicas.¹⁶

Después de la activación del monocito en el tejido, estos se diferencian en macrófagos, los cuales son células de vida prolongada encargados de la homeostasia del tejido y que actúan como primera línea de defensa frente a patógenos externos.¹⁷

Los macrófagos desempeñan funciones clave tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, participando en la defensa del huésped mediante la ingestión de microorganismos a través del proceso de fagocitosis¹⁸. Este proceso implica la formación de organelos citoplasmáticos rodeados de membrana, llamados fagosomas, y su posterior fusión con los lisosomas, los cuales contienen

especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como enzimas proteolíticas cuya función es degradar proteínas microbianas a través del recién formado fagolisosoma¹⁹.

Además de fagocitar microorganismos, los macrófagos eliminan células necróticas y apoptóticas del huésped como parte del proceso de la limpieza posterior a la infección, promoviendo la reparación de tejidos dañados al estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y la síntesis de matriz extracelular rica en colágeno, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis¹⁹.

En cuanto a su papel en la respuesta inmune adaptativa, los macrófagos, al encontrarse en los tejidos, son de las primeras células en entrar en contacto con los microorganismos y actúan como células presentadoras de antígeno, ya que procesan y presentan estos antígenos a los linfocitos T, activándolos según el tipo de respuesta que se vaya a generar. A su vez, los linfocitos T pueden activar a los macrófagos por medio de citocinas, modificando su fenotipo según la requerida. De acuerdo con el tipo de función y de la respuesta inmunológica promovida, los macrófagos se clasifican en dos fenotipos principales: los macrófagos M1 o clásicos, y los macrófagos M2 o alternativos.²⁰

Los macrófagos M1 se activan en respuesta a citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF, por factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e inclusive por productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias. Este fenotipo se caracteriza por su actividad proinflamatoria y microbicida, presentan mayor expresión de marcadores de superficie de reconocimiento de patógenos como TLR-4, y moléculas coestimuladoras como CD86 y CD80, produce citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, además de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS)²¹, para cumplir con el objetivo de la eliminación de patógenos. Sin embargo, una activación prolongada de la polarización M1 puede llevar a un efecto deletéreo en el tejido.

Por otro lado, los macrófagos M2 son activados en presencia de citocinas como IL-4, IL-10, TGF- β y factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)²²⁻²⁴. En el contexto de infección, una vez que se haya eliminado el patógeno, se encarga de la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β para la reparación de tejido y recuperación de la homeostasia tisular. Sin embargo, una polarización inapropiada a este fenotipo puede inhibir la inflamación y reducir la quimiotaxis, además de disminuir la capacidad de presentación de antígenos.^{25,26}

La polarización de los macrófagos no sólo es inducida por estímulos como las citocinas o los patógenos, sino que también puede ser regulada a nivel de expresión de genes que dirigen su polarización. Se han identificado factores de transcripción como STAT1, IRF7, TRAF1 que inducen un fenotipo M1 mientras que factores de transcripción como PPAR γ , STAT3, SMAD se han relacionado con la inducción de la polarización M2²⁷. Estos genes pueden ser modulados por distintos estímulos y condiciones que provocan un cambio de expresión. Por otra parte, estos genes pueden ver regulada su expresión por cambios epigenéticos y/o modificaciones postranscripcionales por ARN no codificante como lo son los miRNAs.²⁸

1.6 miRNAs

Una gran proporción del genoma humano (76-97%) transcribe RNA que no se traduce en proteínas, conocido como RNA no codificante²⁹. Desde su descubrimiento, los RNA no codificantes han cobrado relevancia debido a su participación en la regulación de genes. Dentro de estos RNA no codificantes, destacan los microRNA (miRNAs), las cuales son pequeñas moléculas de un tamaño promedio de 22 nucleótidos de longitud, figura 5.³⁰

Los miRNAs se les ha atribuido su participación en regulación de múltiples procesos, como el ciclo celular, síntesis de proteínas y respuesta inmune³¹. Sin embargo, la presencia de factores externos como en una infección puede

producir un cambio en la expresión de los miRNAs en el huésped y logran tener un papel importante en la resolución de dicha infección³².

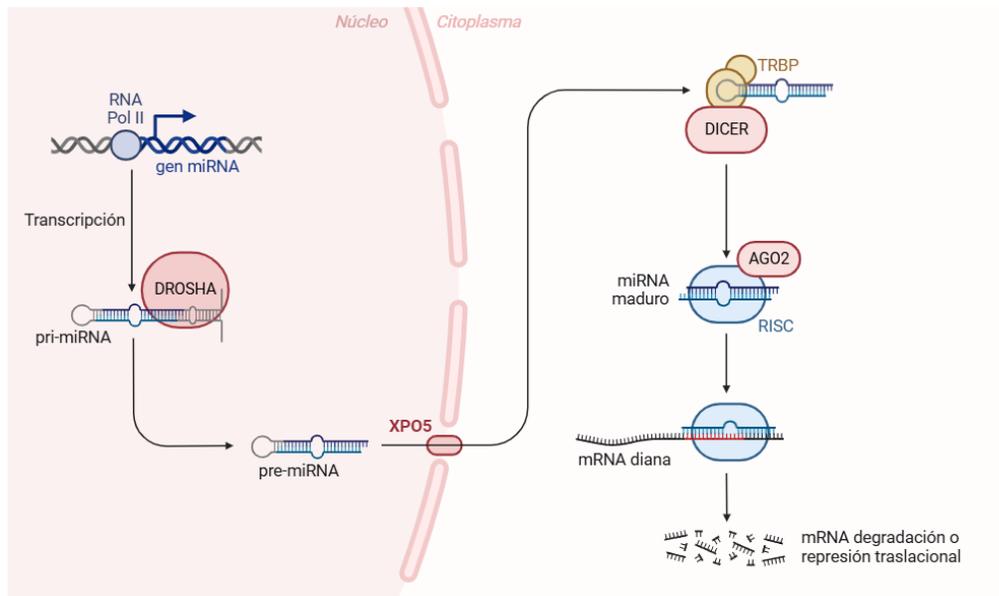


Figura 5. Biogénesis de los miRNAs.

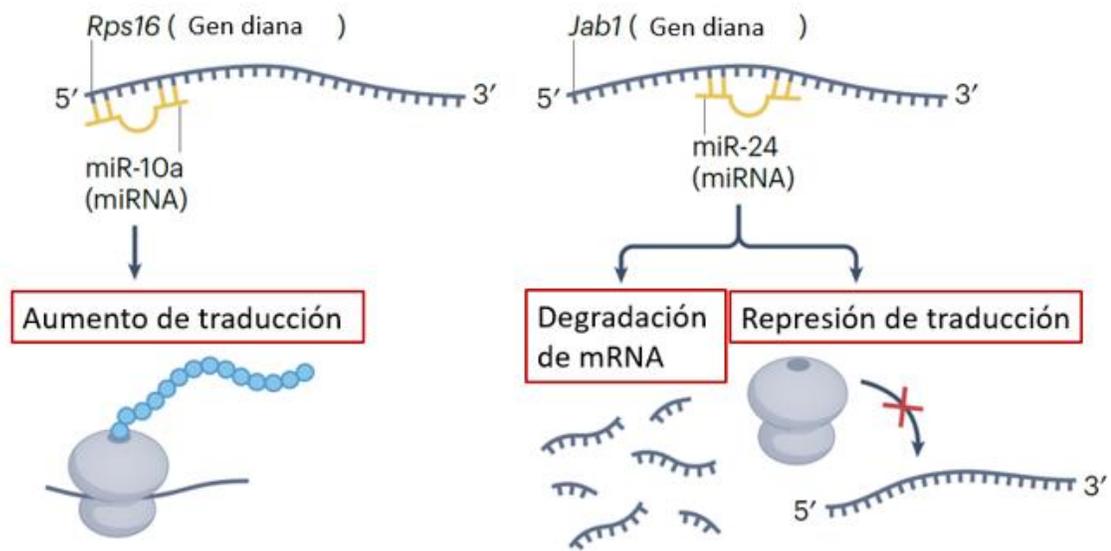
La mayoría de los miRNAs se transcriben de secuencias de ADN como secuencias primarias (pri-miRNAs), las cuales son escindidas por la endonucleasa Drosha generando los precursores de miRNAs (pre-miRNAs). Estos son transportados al citoplasma por exportinas, donde la endonucleasa Dicer los procesa para obtener a los miRNAs maduros en forma de dúplex. El miRNA maduro se divide y una hebra se une a la proteína Ago2, formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).

La función clásica de los miRNAs es la regulación postranscripcional mediante su unión en la región no traducida 3' (3' UTR) de los ARN mensajeros (mRNA), donde pueden ocurrir dos casos: ya sea la represión de la traducción de proteínas o una completa degradación de los mRNA.^{33,34}

Otras funciones no convencionales de los miRNAs son la capacidad de unirse a la región codificante (CDS) o la región 5' UTR de mRNA lo que provoca un aumento en la traducción del gen. Por otra parte, se ha observado algunos miRNAs pueden interactuar directamente con receptores celulares, modulando

cambios de expresión de los genes, figura 6³⁵. Además, se ha reportado la expresión de miRNAs en forma de exosomas, donde son transportados hacia otras células y regular la expresión de estas³⁶⁻⁴¹. Debido a su diversidad funcional, los miRNAs son reconocidos como reguladores clave de la expresión genética, lo que ha motivado su estudio en distintas patologías como cáncer, enfermedades metabólicas e infecciones crónicas.⁴²⁻⁴⁸

A) Interacción con 5' UTR o CDS



B) Actuando como ligandos de TLRs

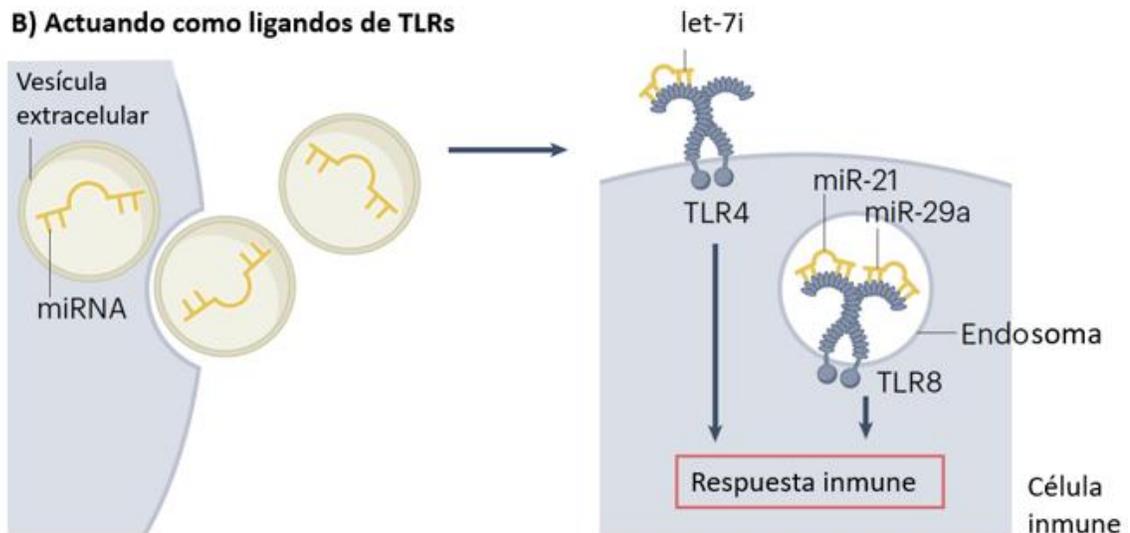


Figura 6. Funciones alternativas de los miRNAs.

A) Su unión a regiones codificantes o a la región 5' UTR. B) Actuando como mediadores de la comunicación intracelular al ser secretadas en vesículas extracelulares y unirse a receptores.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Participación de los miRNAs en infecciones con micobacterias

Los miRNAs desempeñan diversas funciones clave durante procesos infecciosos crónicos, como ocurre en las infecciones intracelulares⁴⁹, donde los miRNAs se regulan la respuesta inmune del huésped⁵⁰ afectando la respuesta adaptativa⁵¹, la inmunomodulación⁵² y la respuesta innata, específicamente en los macrófagos que actúan como células huésped de estos patógenos⁵³. En la tabla 1 se resumen algunos de los miRNAs que modulan la respuesta inflamatoria en las infecciones con *M. tuberculosis*.

Tabla 1 Lista de miRNAs que modulan la respuesta inflamatoria después de la infección con *M. tuberculosis*.

| Nombre del miRNA | Células donde se estudió | Nivel de expresión | Modulación de la respuesta inflamatoria | Función del miRNA |
|------------------|---|--------------------|---|---|
| miR-21 | Células presentadoras de antígenos, células dendríticas | Aumentada | Inhibición de IL-12 | Promueve supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Wu et al., 2012). |
| miR-26 | Macrófagos | Aumentada | Inhibe IFN- γ | Promueve supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Ni et al., 2014). |
| miR-29 | Macrófagos | Aumentada | Inhibe IFN- γ y TNF- α | Promueve supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> ⁵⁶ . |
| miR-132 | Macrófagos | Aumentada | Inhibe IFN- γ | Promueve supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Ni et al., 2014). |

| | | | | |
|---------|---------------------------------------|------------|---|--|
| miR-155 | Macrófagos | Aumentada | Promueve IFN- γ , inhibe IL-6, IL-10 | (Iwai et al., 2015; Rothchild et al., 2016). |
| miR-203 | Macrófagos | Aumentada | Inhibe NF-kB, TNF- α , IL-6 | Promueve supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Wei et al., 2013). |
| miR-99 | Macrófagos, Células dendríticas | Aumentada | Inhibe TNF- α , IL-6, IL- 8 | Promueve supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Singh et al., 2013). |
| miR-149 | Macrófagos | Disminuida | Promueve TNF- α , IL-6, IFN- γ | Inhibe supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Xu et al., 2014). |
| miR-20b | Macrófagos | Disminuida | Promueve IL-18, IL-1 β | Inhibe supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Kumar et al., 2015). |
| miR27a | Macrófagos | Disminuida | Promueve IFN- γ , IL- 1b, IL-6, TNF- α | Inhibe supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> (Lou et al., 2017). |

Se ha estudiado extensivamente el efecto de los miRNAs en la infección de macrófagos por micobacterias, encontrando resultados diversos. Por ejemplo, en estudios *in vitro* e *in vivo* de macrófagos infectados con micobacterias, miR-21 se ha asociado a un aumento de la supervivencia de bacterias intracelulares al existir un aumento en la apoptosis de células competentes^{65–69}, para el caso de miR-26 y miR-132 se ha observado como el aumento de la expresión disminuye la capacidad fagocítica de los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*⁷⁰. Respecto a miR-29 se le ha relacionado con una disminución a la respuesta a IFN- γ en modelos *in vivo* cuando son infectados con micobacterias⁷¹, figura 7. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el papel de los miRNAs en el contexto de infecciones por *N. brasiliensis*, por lo tanto, es necesario comenzar

con una exploración que nos permita generar conocimiento y entender un poco más de la patología del actinomicetoma.

(a) miR-29, miR-21, miR-let-7f, miR-132, miR-26a

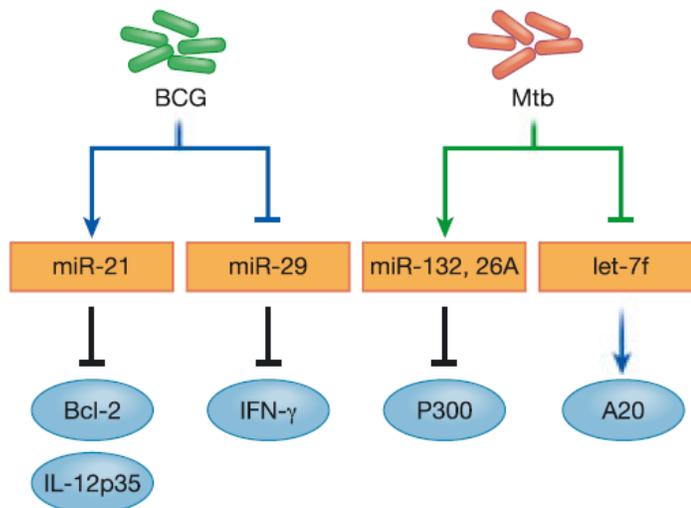


Figura 7 Genes que regulan los miRNAs en infección con micobacterias.

miR-21 regula genes de Bcl-2 e IL-12p35 en infección con BCG, mientras que miR-29 está asociada a la regulación de genes de respuesta de IFN-γ. miR-132 y miR-26a regulan cofactores como P300 en infecciones con *M. tuberculosis* que promueve la supervivencia bacteriana.

2.2 Infección por *Nocardia brasiliensis* en macrófagos

Nuestro grupo de trabajo ha evaluado la respuesta inmunológica contra la infección por *N. brasiliensis* en modelos *in vivo* e *in vitro*. En un estudio realizado en murinos se evaluó el desarrollo del actinomicetoma, donde ha destacado el papel de la producción de óxido nítrico en la formación del granuloma⁷². También se ha resaltado el papel de los lípidos de la pared celular de *N. brasiliensis*, los cuales tienen efectos en la respuesta inmune disminuyendo la producción de óxido nítrico⁷³ y afectando la actividad microbicida de los macrófagos al inducir la formación de células espumosas⁷⁴.

En otro reporte en modelo murino de infección por *N. brasiliensis*, se observó un cambio en la expresión de genes relacionados con la polarización M1 y M2,

donde en fases agudas esta caracterizado un aumento de expresión de genes proinflamatorios, mientras que, en la fase crónica de la infección, a los 30 días post infección ocurre un aumento en los genes antiinflamatorios⁷⁵.

En otro estudio realizado *in vitro* se ha descrito que la infección con *N. brasiliensis* induce la formación de células espumosas a partir de macrófagos y células dendríticas de ratón⁷⁴, las cuales se ha reportado que están relacionadas al fenotipo M2 y proporcionan un ambiente favorable para micobacterias⁷⁶. Sin embargo, aún no se ha podido determinar con claridad la causa de estos cambios de expresión ni los mecanismos que pueden regular estos cambios genéticos en el macrófago.

Por lo tanto, se reconoce que los macrófagos desempeñan un papel importante en la infección por *N. brasiliensis*. Además, existen antecedentes que indican que la infección de macrófagos por micobacterias induce la expresión de miRNAs, los cuales regulan la respuesta inflamatoria. Esto plantea la duda si en la infección por *N. brasiliensis* existe un cambio en la expresión de estas moléculas y cuál podría ser su efecto en la respuesta inflamatoria y en la modulación del sistema inmune.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que, en infecciones de macrófagos por micobacterias, los miRNAs pueden modular la respuesta inmune del huésped mediante la alteración de genes inflamatorios.

Aunque se ha descrito el efecto que tiene *Nocardia brasiliensis* en la respuesta inmune, no se ha investigado la posible participación de los miRNAs como un mecanismo de regulación de la respuesta inmune durante la infección.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

La infección de macrófagos *in vitro* con *Nocardia brasiliensis* aumenta la expresión de miR-21, miR-26 y disminuye la expresión de miR-29.

CAPÍTULO V

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la expresión de miRNAs en macrófagos infectados in vitro con *N. brasiliensis*.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c en macrófagos infectados in vitro con *N. brasiliensis*.
2. Analizar in silico los miRNAs expresados diferencialmente en macrófagos infectados con patógenos intracelulares

CAPÍTULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestra sanguínea

A partir de un grupo de sujetos masculinos clínicamente sanos (n=5) que aceptaron participar en el estudio, proporcionando su consentimiento verbal y cumplieron con los criterios que se aprecian en la tabla 2, se extrajeron 16 mL de sangre venosa periférica en tubos con EDTA.

Se realizó una biometría hemática para confirmar que no presentaran alteraciones en el número de células y para continuar con el procedimiento. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron por gradiente de densidad utilizando el reactivo Ficoll-Paque Plus, el cual tiene una densidad de 1.077, lo que permite la separación de éstas.

Tabla 2 Criterios para el reclutamiento de donadores clínicamente sanos

| Criterios de selección | Criterios de exclusión | Criterios de eliminación |
|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| Sexo masculino entre 20 y 30 años | Enfermedad pulmonar activa en los últimos 3 meses | Leucopenia |
| Aparentemente sanos | Tratamiento con inmunosupresores | Leucocitosis |

6.2 Purificación de monocitos con selección negativa

Los monocitos fueron purificados a partir de las PBMCs mediante selección negativa, empleando el kit de separación Pan Monocyte Isolation Kit de Miltenyi Biotec (Cat. #130-096-537), siguiendo las instrucciones del proveedor. El procedimiento consistió en trabajar con un máximo de 10×10^6 de células

mononucleares, a las cuales se les añadió 10 µL reactivo bloqueador de FcR y 10 µL de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina, que se unen a todas las células excepto a los monocitos. Las células se dejaron incubar por 5 minutos en refrigeración.

Posteriormente, se les añadió 20 µL de perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-biotina, y se incubaron por 10 minutos en refrigeración. Se ajustó el volumen a 500 µL de buffer y se coloca en una columna MS de Miltenyi Biotec (Cat. #130-042-201), donde se recolectaron las células sin marcar.

Se lavó la columna con 500 µL de buffer, y se contaron los monocitos aislados utilizando azul de tripano en cámara de Neubauer. Finalmente, los monocitos purificados, se cultivaron en medio RPMI 1640 completo suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 3 días para su adhesión y diferenciación en MDMs.

6.3 Análisis de pureza y viabilidad de los macrófagos

El análisis de la pureza del aislamiento de monocitos y de macrófagos se realizó con el citómetro BD LSRFortessa™ Cell Analyzer. Para el análisis de la población de interés, se utilizó un anticuerpo CD-14 conjugado con Alexa Fluor 488 y para la viabilidad se usó Calcein Blue conjugado con Pacific Blue.

6.4 Cepa bacteriana de *Nocardia brasiliensis*

La cepa que se utilizó en este proyecto fue *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, registrada en el ATCC con el número 700358. Esta bacteria fue obtenida del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, a partir de un paciente diagnosticado con actinomicetoma.

6.5 Preparación del inóculo de *Nocardia brasiliensis*

La cepa de *Nocardia brasiliensis* se aisló a partir de un actinomicetoma de un ratón con 45 días de infección. Se cultivó en caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 37 °C durante 3 días, en agitación moderada. Posteriormente, se recuperó y se lavó la biomasa con solución salina estéril, sometiéndola a centrifugación 1500

rpm durante 10 minutos, repitiendo el proceso hasta eliminar cualquier rastro de caldo.

Enseguida se descartó el sobrenadante cristalino y la biomasa se resuspendió en 10 mL de solución salina estéril, transfiriéndola a un homogeneizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem estéril. Posteriormente, se trituró la biomasa bacteriana hasta obtener una suspensión homogénea, la cual se llevó a centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante.

Al sobrenadante se le determinó la concentración empleando el método de McFarland, que consistió en leer la densidad óptica a 600 nm. Se ajustó la bacteria a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 con medio sin antibiótico para la infección de las células.

6.6 Infección con *N. brasiliensis*

Se infectaron 0.2×10^6 MDMs por 2 horas con *N. brasiliensis* con una MOI de 10 en medio RPMI sin antibiótico, y se incubaron por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de infección, se removió la bacteria extracelular con lavados usando PBS. Posteriormente se mantuvieron en medio RPMI con antibiótico por 1 día.

6.7 Confirmación de la infección

Para la confirmación de la infección, se realizó el cultivo de 0.03×10^6 monocitos en *Chamber Slides* para su posterior infección de las células tinción con Kinyoun. La tinción de Kinyoun se realizó tiñendo por 5 minutos con fucsina fenicada (diluida 1:5, después se destiñó con agua de llave y ácido sulfúrico al 1%, enseguida se tiñó con azul de metileno por 1 minuto; finalmente se lavó con agua de llave. Una vez seca la preparación, se observó al microscopio de luz con objetivo de 100x. Se midió el tamaño del citoplasma de las células empleando el software Motic Images Plus 3.0, se calculó el diámetro del macrófago y se comparó con células no infectadas.

6.8 Extracción de RNA

Para la extracción del material genético se realizó una lisis de las células con el reactivo QIAzol del kit miRNeasy Mini (QIAGEN), que se basa en una extracción con tiocianato de guanidina y cloroformo, y centrifugación a través de columnas. El RNA total se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La concentración de RNA fue cuantificada mediante espectrometría empleando un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones de RNA obtenidos fueron de $40.36 \pm 37.76\text{ ng}/\mu\text{L}$ con relación de las absorbancias $A_{260}/_{280}$ en 1.42 ± 0.23 y de $A_{260}/_{230}$ de 0.37 ± 0.29 .

6.9 Síntesis de cDNA

Para la síntesis del cDNA se empleó el kit miScript II RT (QIAGEN) usando hasta $1\text{ }\mu\text{g}$ del templado de RNA. Se preparó el master mix como se presenta en la tabla 3:

Tabla 3 Composición del master mix para la síntesis de cDNA

| Componente | Volumen |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Buffer 5x miScript HiFlex | 4 μL |
| 10x miScript Nucleics Mix | 2 μL |
| Agua libre de Rnasas | Suficiente para aforar |
| Transcriptasa Inversa miScript Mix* | 2 μL |
| Templado de RNA | Suficiente para 100 ng |
| Volumen total | 20 μL |

Se dejó incubando por 60 min a 37°C y 5 min a 95°C . Se cuantificó el cDNA empleando un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones de cDNA obtenidos fueron de $538.45 \pm 92.60\text{ ng}/\mu\text{L}$ con relación de las absorbancias $A_{260}/_{280}$ en 2.084 ± 0.04 y de $A_{260}/_{230}$ de 1.92 ± 0.24 . Se almacenó en congelación a -20°C para su uso en la PCR tiempo real.

6.10 Expresión de miRNAs por qPCR

Para la PCR cuantitativa se empleó 500 ng de cDNA en 2 μ L y se emplearon las siguientes sondas TaqMan:

- miR-21-5p VIC (Applied Biosystem, ID: Hs04231424_s1)
- miR-26b-5p FAM (Applied Biosystem, ID: Hs04231429_s1)
- miR-29c-3p FAM (Applied Biosystem, ID: Hs04231537_s1)

Se empleó como gen endógeno RNU48 FAM en sonda TaqMan (Applied Biosystems, PN:4440887) y se configuró el termociclador de la siguiente manera:

1. 50° C por 2 min
2. 95° C por 10 min
3. 95° C por 15 seg
4. 60° C por 1 min

- Por 49 ciclos
- Volumen final 20 μ L

La qPCR fue realizada utilizando iQ Supermix (Cat. #170-8862, Bio-Rad, Hercules, CA) preparando el master mix como se muestra en la tabla 4:

Tabla 4 Composición del master mix para la qPCR

| Reactivo | Reacción 1X | Reacción 30X + 10% |
|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| Sonda | 1 μ L | 33 μ L |
| iQ Super Mix | 10 μ L | 330 μ L |
| cDNA | 2 μ L | --- |
| RNase free water* | 8 μ L | 264 |
| Volumen final | 20 μL | |

La expresión relativa se realizó empleando el método de Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁷⁷.

6.11 Análisis *in silico*

Para el análisis *in silico* se emplearon bases de datos transcripcionales de macrófagos infectados por micobacterias y bases de datos de genes diana de miRNAs que sean tanto predictivos como bases de datos ya validados experimentalmente. Estos se analizaron usando software como GEO2R, GSEA, STRING y Cytoscape para el enriquecimiento funcional de los genes que se obtengan mediante el uso de estos programas.

6.12 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Posterior a ello, realizó el análisis de ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey (para aquellos datos paramétricos). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de U de Mann-Whitney (para aquellos datos no paramétricos). Los cálculos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

6.13 Estrategia general

La estrategia general, figura 8.

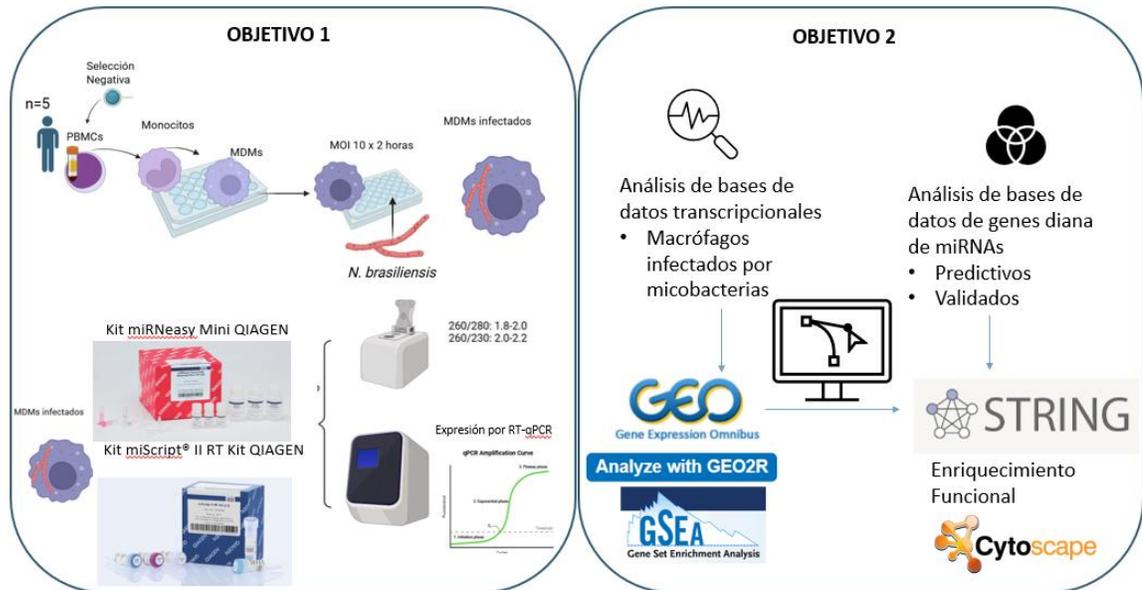


Figura 8. Esquema de la estrategia general.

Se reclutaron donadores de sangre venosa periférica donde por aislamiento negativo se aislaron monocitos que se diferenciaron en MDMs por adherencia y se infectaron con *N. brasiliensis*. Se extrajo el RNA con enriquecimiento de fracción de miRNAs de los cuales se sintetizó el cDNA y se analizó la expresión por qPCR. Además, se realizó un análisis *in silico* con bases de datos transcripcionales y bases de datos de genes diana de miRNAs donde se les realizó un enriquecimiento funcional.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS

7.1 Reclutamiento de donadores

A partir de los resultados de la biometría hemática, se confirmó su estado clínicamente sano. El promedio de de leucocitos fue de 6656 ± 1005 células/ μL y de los monocitos fue de 568 ± 122 células/ μL . Según los valores de referencia en el país para la población masculina⁷⁸, se encuentran dentro de los valores normales como se observa en la tabla 5. por lo que se continuó la extracción de PBMCs, el aislamiento de monocitos y su posterior diferenciación.

Tabla 5. Resultados de la biometría hemática de los donadores.

| | PROMEDIO | VALORES NORMALES |
|---------------------------------------|------------------|------------------|
| LEUCOCITOS (células/ μL) | 6656 ± 1005 | 4500-10000 |
| NEUTRÓFILOS (células/ μL) | 3764 ± 960 | 1530-7400 |
| NEUTRÓFILOS (%) | 56.11 ± 8.76 | 34.00-74.00 |
| LINFOCITOS (células/ μL) | 2101 ± 537 | 940-4800 |
| LINFOCITOS (%) | 31.82 ± 7.02 | 21.00-48.00 |
| MONOCITOS (células/ μL) | 568 ± 122 | 90-800 |
| MONOCITOS (%) | 8.7 ± 2.34 | 2.00-8.00 |
| EOSINÓFILOS (células/ μL) | 193 ± 69 | 40-400 |
| EOSINÓFILOS (%) | 2.92 ± 1.12 | 1.00-4.00 |
| BASÓFILOS (células/ μL) | 30 ± 14 | 10-100 |
| BASÓFILOS (%) | 0.45 ± 0.20 | 0.00-1.00 |

7.2 Diferenciación de monocitos a macrófagos

Primero se realizó el aislamiento de monocitos a partir de los PBMCs empleando columnas magnéticas de selección negativa, donde obtuvimos un rendimiento de 17%; y se redujo la presencia de detritos celulares, permitiendo la elución de los monocitos los cuales se continuo los experimentos, figura 9.

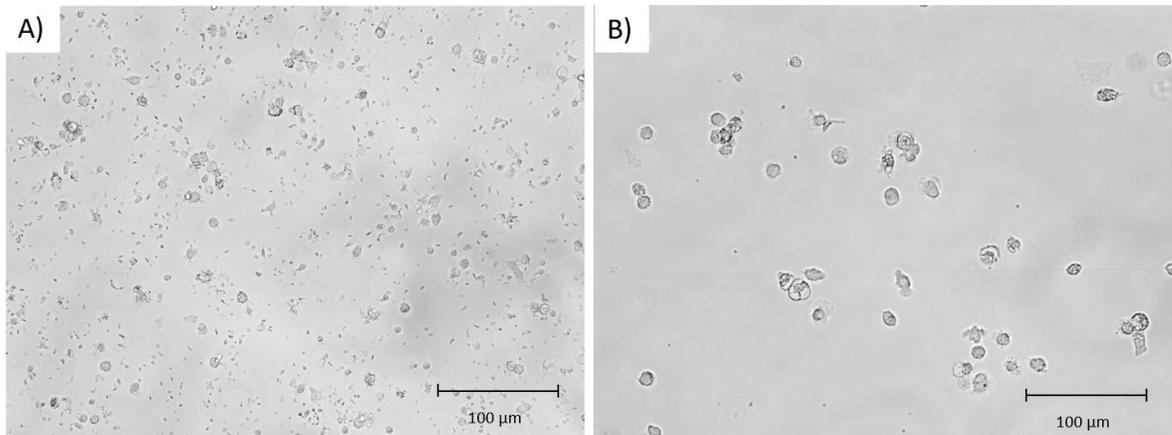


Figura 9. Imágenes representativas de 0.1×10^6 células en cultivo con medio RPMI 1640 completo en placa de 6 pocillos a 37°C 5% CO_2 .

A) Células mononucleares sin purificar en cultivo de 2 horas, B) Monocitos purificados por selección negativa en cultivo de 2 horas.

A partir de 0.2×10^6 monocitos aislados, se cultivaron durante 3 días en medio RPMI 1640 completo a 37°C y 5% de CO_2 en placa de 6 pocillos para permitir la diferenciación a macrófagos derivados de monocitos dejándolos adherir en la placa. Transcurrido el tiempo, se observó un aumento del citoplasma de las células, además de una mayor adherencia a la placa al tener una morfología más estrellada, figura 10.

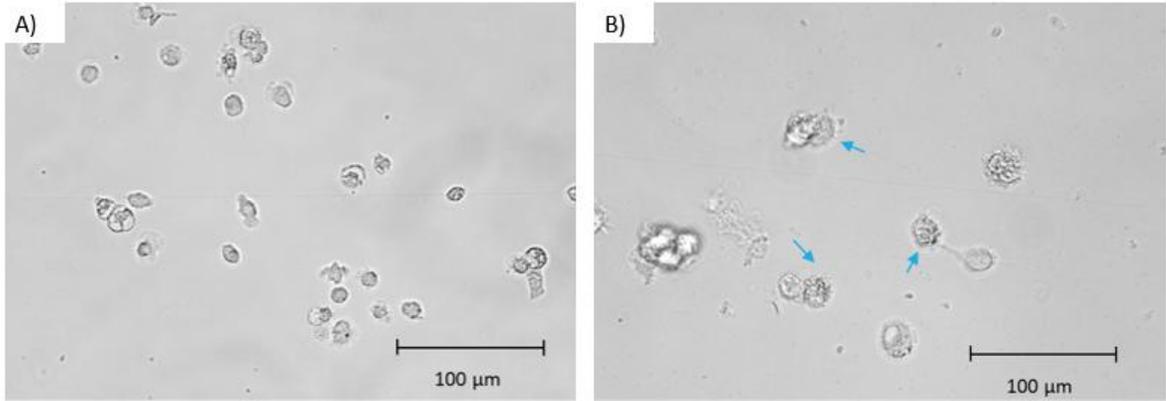


Figura 10. Imágenes representativas de 0.1×10^6 monocitos cultivados en placa de 6 pocillos con medio RPMI 1640 completo a 37°C 5% CO_2 .

A) Monocitos en cultivo de 2 horas , B) Macrófagos derivados de monocitos adheridos a la placa en cultivo de 3 días.

Se evaluó la pureza y viabilidad de los MDMs con la finalidad de determinar que no hubo muerte celular de estas mismas antes de la infección, lo cual podría alterar los resultados de la expresión de miRNAs. Se empleó la estrategia de gating de la figura 11.

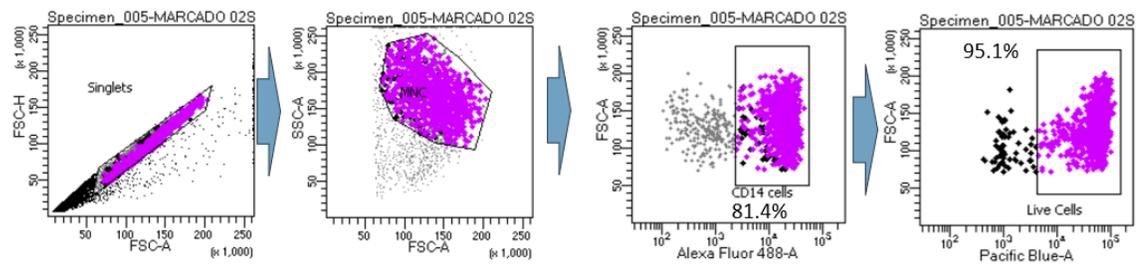


Figura 11. Estrategia de gating del análisis por citometría de flujo.

De los singlets se seleccionó el clúster de la población de mononucleares donde de estos se seleccionó los CD14 positivos como los monocitos/macrófagos y se determinó la población de células vivas con el marcador de Calcein Blue.

No se encontró ninguna diferencia significativa al comparar el porcentaje de células CD14+ ni en el porcentaje de viabilidad entre los monocitos y MDMs, ver figura 12.

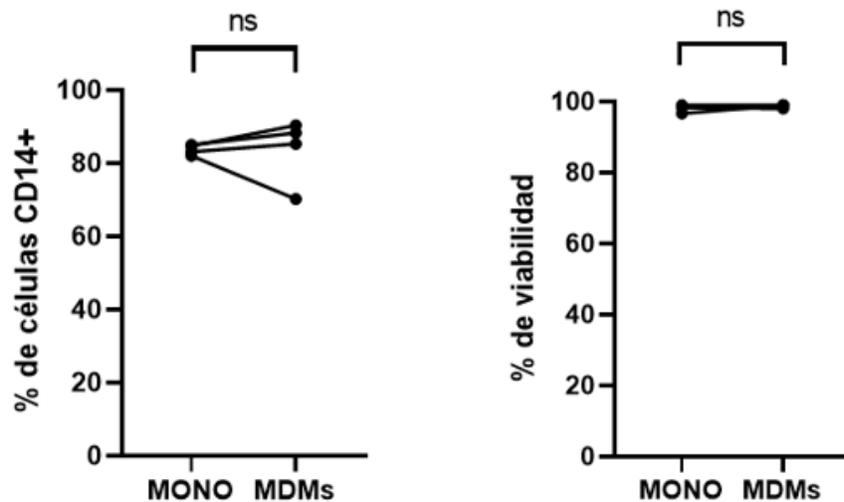


Figura 12. Porcentaje de células CD14+ y de viabilidad de monocitos y MDMs evaluados por citómetro de flujo LSRFortessa.

Comparación entre los monocitos recién aislados con MDMs despegados de la placa posterior a su cultivo en medio RPMI 1640 completo por 3 días a 37°C 5% CO₂. n=4, Prueba t pareada, p=0.423. MONO: Monocitos; MDMs: Macrófagos derivados de monocitos.

7.3 Preparación de la cepa de *N. brasiliensis*

La bacteria se identificó por tinción de Kinyoun; además se le realizó una confirmación de cepa por metodología MALDI-TOF. Con la confirmación de la cepa realizada, se procedió con la disgregación mecánica de la bacteria para su cuantificación y ajuste a un MOI de 10 según la bibliografía.⁷⁹

7.4 Infección de MDMs con *N. brasiliensis*

Se infectaron los MDMs con *N. brasiliensis* a una MOI de 10 durante 2 horas, y posterior de la infección se realizó la tinción de Kinyoun modificada, para poder

identificar las bacterias dentro de las células. Estas se observaron y analizaron utilizando un microscopio de luz y el software Motic Images Plus 3.0; con el cual se tomaron fotografías y se midió el diámetro de las células. Se compararon 3 grupos experimentales: células sin infección, células infectadas por 2 horas y células infectadas por 20 horas. Observamos diferencia significativa entre las células no infectadas y las células infectadas por 2 horas y 20 horas, sin embargo, no se observó diferencia significativa ($p= 0.183$) entre la infección de 2 horas y la de 20 horas, por lo que se continuó con la infección de 2 horas, figura 13.

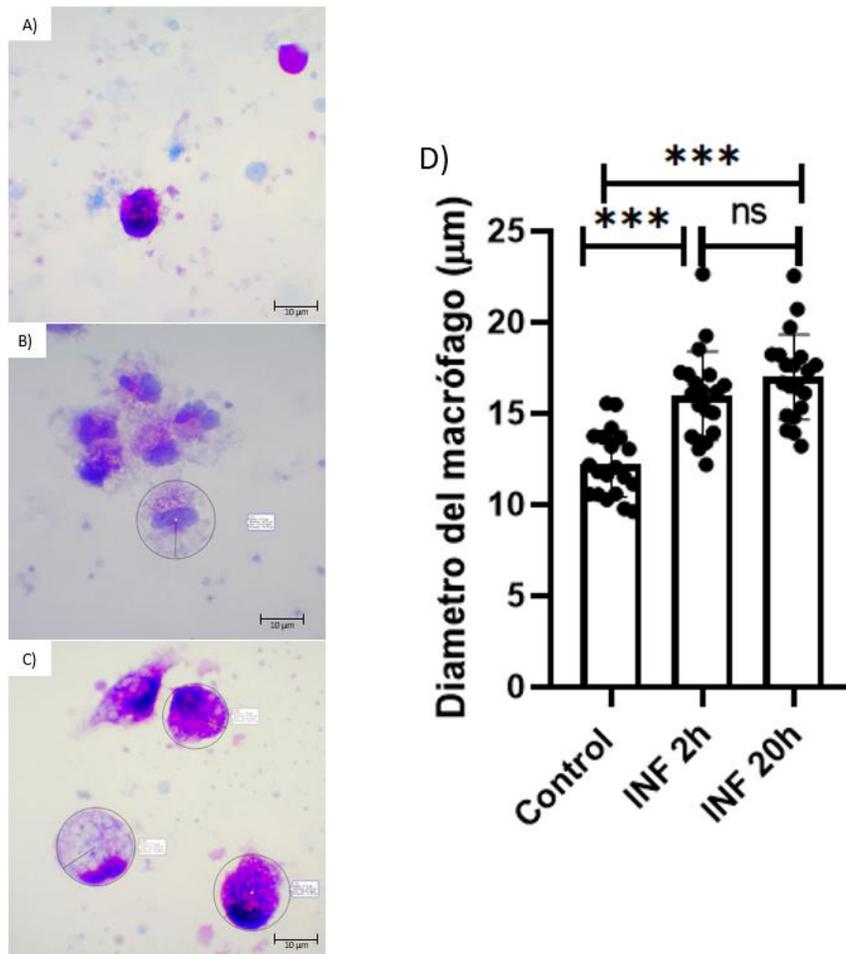


Figura 13. Cambio en el tamaño del citoplasma de los macrófagos sin infección contra macrófagos infectados 2 horas y 20 horas.

Imágenes representativas de MDMs infectados con *N. brasiliensis* en medio RPMI 1640 completo a 37°C 5% CO₂ en Chambers Slides e infectadas. A)

Células no infectadas, B) Células infectadas por 2 horas, C) Células infectadas por 20 horas. D) ANOVA de una vía con post hoc de Tukey, $n=3$, $*** p<0.001$; INF: Infección.

También observamos que los MDMs infectados por 2 horas adquirieron morfología compatible con células espumosas por una múltiple aparición de vesículas, sin embargo, queda pendiente la tinción confirmatoria de rojo oleoso para identificar los lípidos dentro de la célula, figura 14.

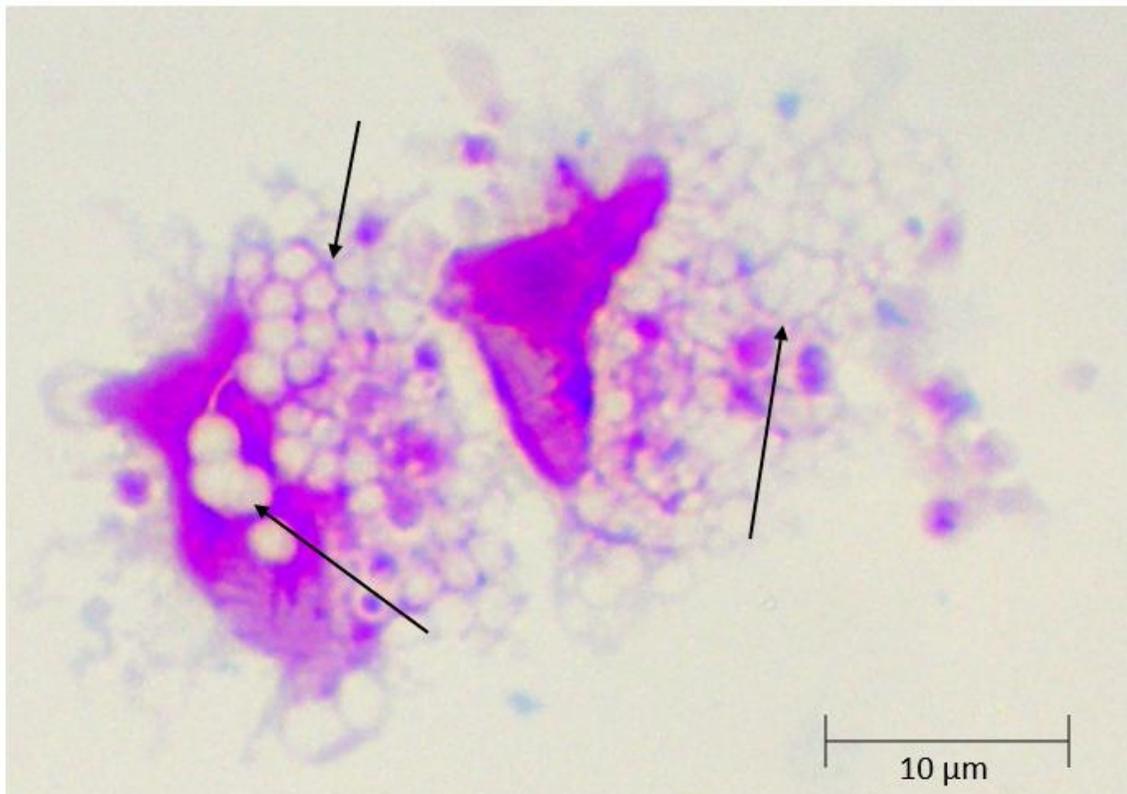


Figura 14. Imagen representativa de los macrófagos infectados por *N. brasiliensis* durante 2 horas a una MOI de 10.

Las flechas indican posible presencia de vacuolas lipídicas.

7.5 Análisis de la expresión génica de los miRNAs en macrófagos infectados

La expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c se evaluó mediante la técnica de qPCR, y se analizó por el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$)⁷⁷. También se evaluó la estabilidad del gen housekeeping empleando el software RefFinder.⁸⁰ El gen RNU48 fue el más estable en nuestras condiciones, por lo que se decidió utilizarlo para nuestros experimentos.

Se encontró un aumento de la expresión relativa, de miR-21, miR-26b y miR-29c, estadísticamente significativo en macrófagos infectados respecto a los macrófagos sin infección, figura 15.

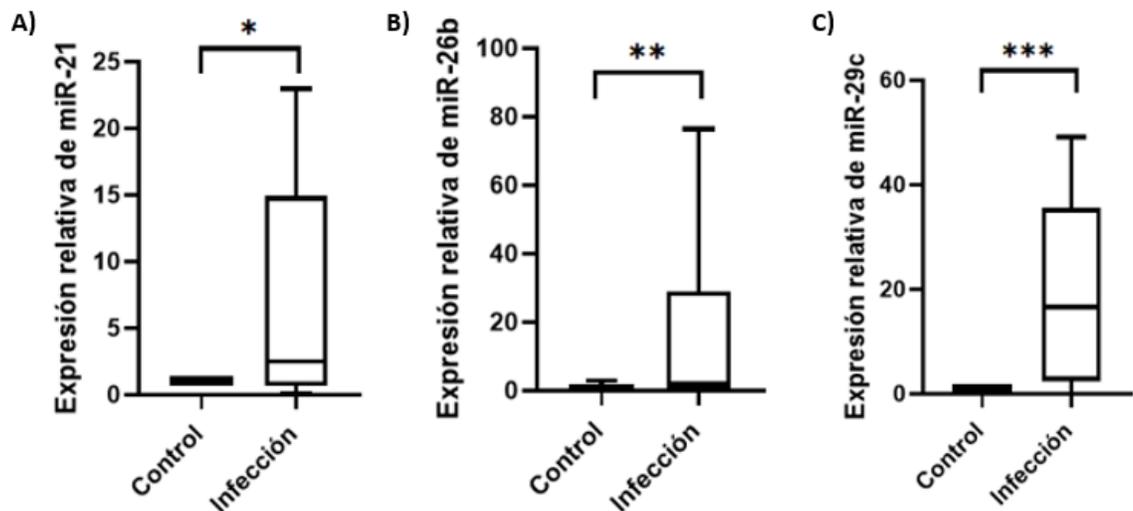


Figura 15. Análisis de la expresión relativa de miRNAs en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* por 2 horas a un MOI de 10.

Se realizó una comparación entre ambos grupos. A) miR-21 B) miR-26b y C) miR-29c. U de Mann-Whitney, n=5, *p=<0.05, **p=<0.01, ***p=<0.001.

7.6 Análisis *in silico* de bases de datos de genes diana de miRNAs

Para el análisis se seleccionaron 6 bases de datos de genes diana de miRNAs, los cuales se dividieron en 2 categorías: Bases de datos de genes predictivos

(TargetScan, ENCORI, MicroT y miRDB) y bases de datos de genes validados (TarBase y miRWalk).

Para las bases de datos de genes predictivos se seleccionaron los que tuvieran un punto de corte elevado, dependiendo del score asignado en cada base de datos. De esta manera se obtuvieron 64 genes para miR-21, 90 para miR-26b y 113 para miR-29c. De estos, se seleccionaron los que fueran compartidos entre varias bases de datos, con el fin de tener mayor certeza de que los genes si estuvieran siendo regulados por los miRNAs. Por último, se introdujeron en el software STRING para realizar un análisis de enriquecimiento funcional y observar posibles vías afectadas por la regulación de estos genes.

Para miR-21 se vieron enriquecidas vías como la vía de las MAP cinasas, la cascada ERK1/ERK2 y vías de regulación de la traducción de señales, figura 16.

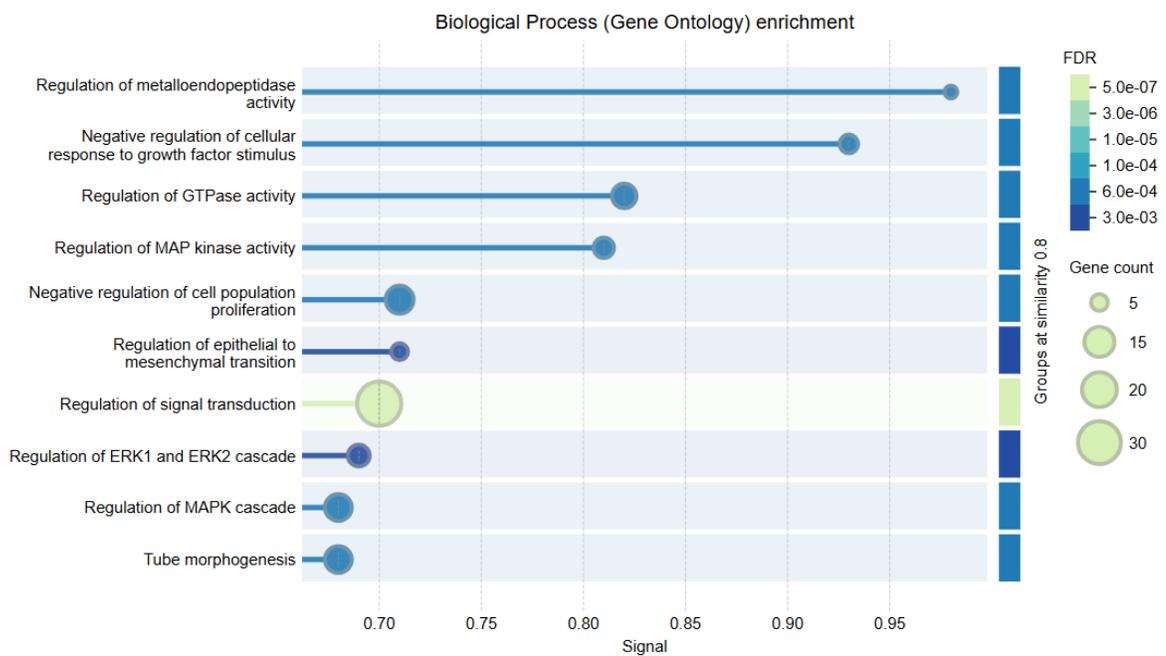


Figura 16. Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados predichos por miR-21, empleando el software STRING.

FDR: False Discovery Rate.

Por otra parte, las vías que se vieron enriquecidas por los genes regulados por miR-26b incluyeron procesos de modificación de proteínas, regulación del metabolismo de nitrógeno y regulación del proceso metabólico celular, figura 17.

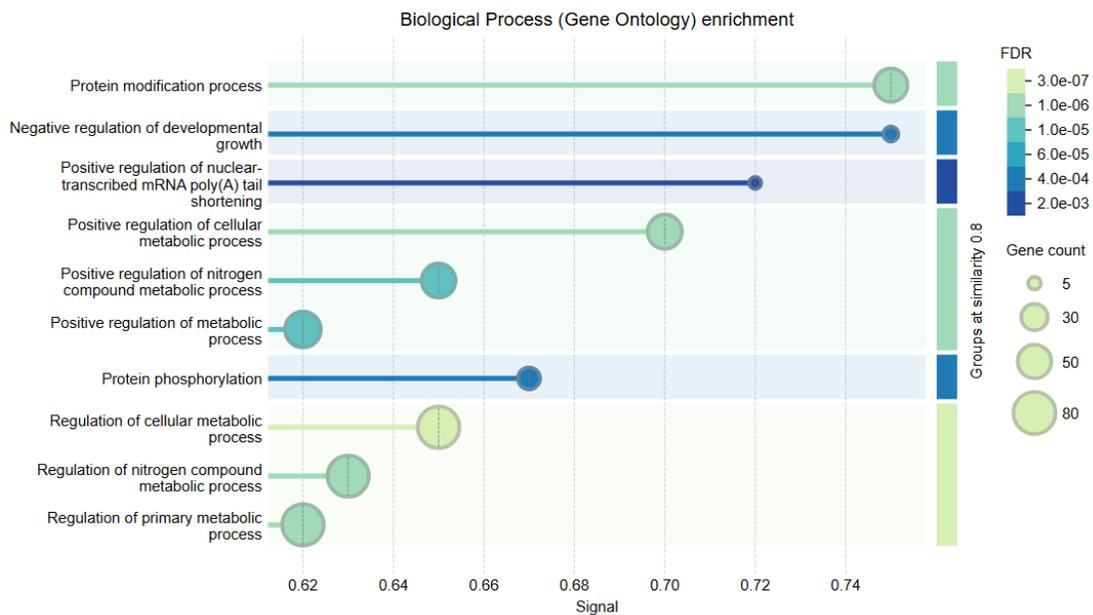


Figura 17. Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados predichos por miR-26b, empleando el software STRING.

FDR: False Discovery Rate.

En cuanto a los genes regulados por miR-29c, se encontraron enriquecidas vías relacionadas a la organización de la matriz extracelular, la respuesta a aminoácidos y la organización de las estructuras de colágeno, figura 18.

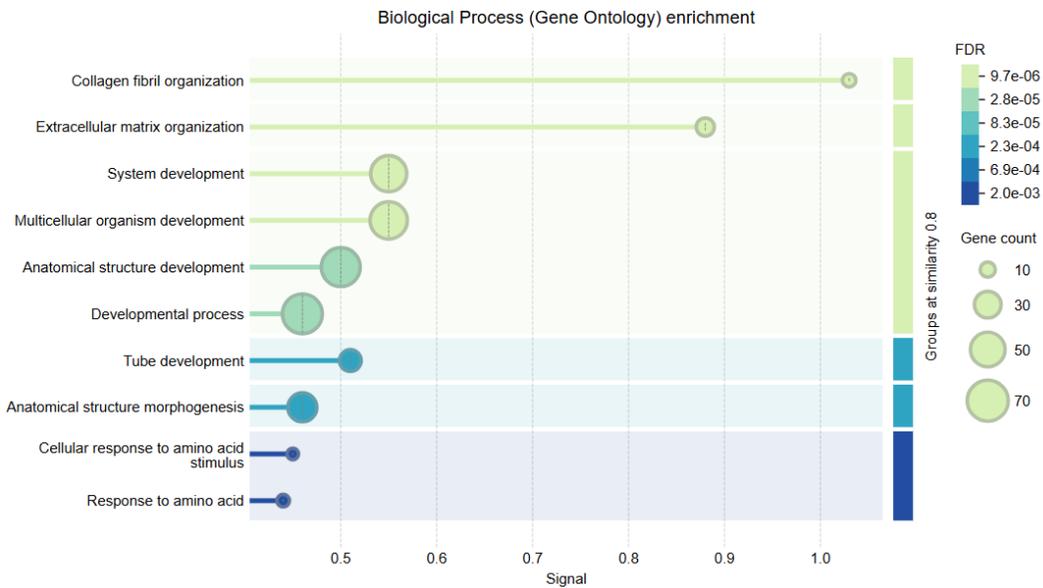


Figura 18. Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados predichos por miR-29c, empleando el software STRING.

FDR: False Discovery Rate.

Para poder complementar estos resultados, se analizó el enriquecimiento funcional de vías de genes diana validados experimentalmente por los tres miRNAs. Entre las vías enriquecidas destacan vías del metabolismo de ácidos grasos, la vía de señalización de TGF- β , la vía de señalización de p53 y la vía de señalización de FoxO, entre otras, figura 19.

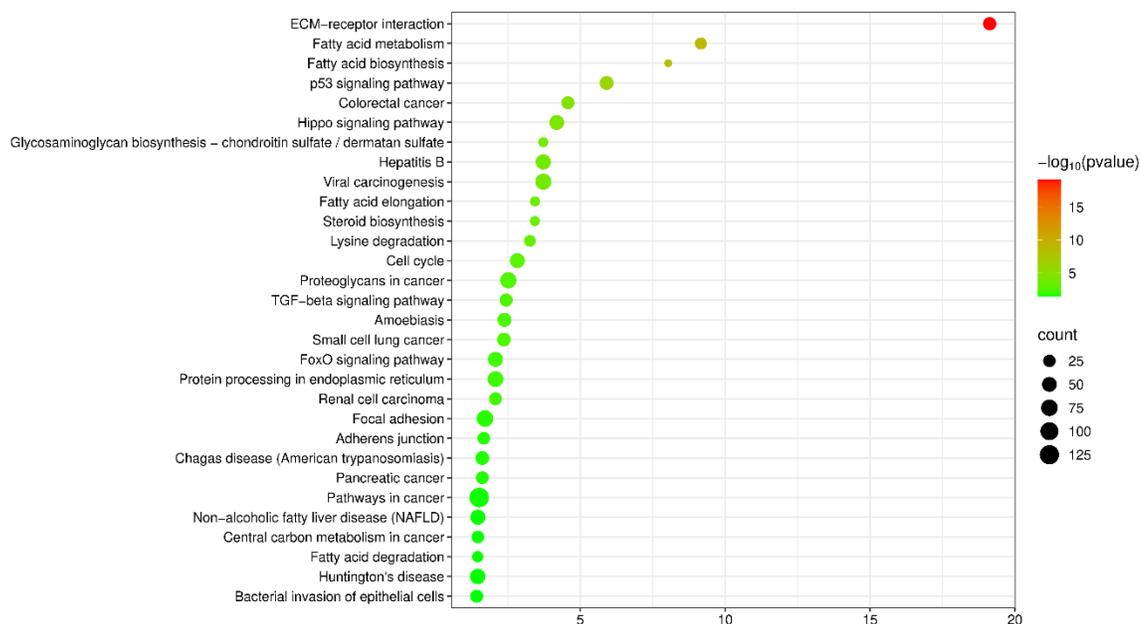


Figura 19 Análisis de enriquecimiento funcional de genes regulados validados experimentalmente por miR-21, miR-26b y miR-29c.

Software miRPath v.3

7.7 Análisis *in silico* de bases de datos transcripcionales de macrófagos infectados con micobacterias

Para el análisis de bases de datos transcripcionales, se empleó la base de datos reportada en el artículo publicado por Lavalett y colaboradores⁸¹. Esta base está compuesta por un análisis de genes por microarreglo, donde se evaluaron macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (4 controles sin infección y 10 pacientes con tuberculosis activa). De los datos obtenidos se seleccionaron los genes diferencialmente expresados entre los dos grupos; debido a la gran cantidad de genes, se eligieron los 50 más sobreexpresados y los 50 más subexpresados. Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para identificar las vías más alteradas, así como una

comparación con 18 vías relacionadas con la respuesta inmune, con el fin de determinar cuáles de estas vías se encontraban más afectadas (Tabla 6).

Finalmente, se llevó a cabo una comparación entre los genes diana de los miRNAs y los genes diferencialmente expresados en estas vías de respuesta inmune, para identificar cuáles genes pudieran estar involucrados en la infección. Para miR-21, se observaron genes como CCL20, IL12A, STAT3, FASLG, entre otros. Para miR-26b, se identificaron genes como PRKCD, PTEN y ACSL3. En cuanto a miR-29c, se obtuvieron genes como TNFRSF1A, SH3GLB1 y TRAF4.

Tabla 6. Vías de señalización relacionadas con la respuesta inmune con cambios en el enriquecimiento funcional por infección con *M. tuberculosis*.

| Vía de señalización | Cambio en la expresión |
|-------------------------------|------------------------|
| Defensa contra bacterias | Aumento |
| Activación del macrófago | Sin cambios |
| Señalización de IFN- γ | Aumento |
| Respuesta a IFN- γ | Aumento |
| Fagocitosis | Disminución |
| Maduración del fagosoma | Disminución |
| Producción de NO | Sin cambios |
| Metabolismo de ROS | Disminución |
| Autofagia | Disminución |
| Apoptosis | Sin cambios |
| Señalización de TNF | Aumento |
| Señalización de IL-4 | Disminución |
| Señalización de IL-6 | Aumento |
| Señalización de IL-10 | Aumento |
| Inflamosoma | Aumento |
| Metabolismo de ácidos grasos | Disminución |
| Glucólisis | Disminución |
| Formación del lisosoma | Sin cambios |

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN

El actinomicetoma es una infección crónica granulomatosa causada principalmente por *N. brasiliensis*, una bacteria intracelular facultativa. Los mecanismos celulares y moleculares implicados en el actinomicetoma siguen siendo en gran parte desconocidos. Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para evaluar la respuesta inmune celular^{79,82} y humoral⁸³ adaptativa frente a este patógeno. Sin embargo, la respuesta inmune innata no ha sido descrita en detalle. La interacción con el huésped es una relación compleja y puede verse afectada por diversos factores externos. Dentro de esta interacción, probablemente participan los miRNAs; no obstante, hasta la fecha, no se ha reportado su expresión durante la infección por *N. brasiliensis*, por lo que en este trabajo se buscó explorar esta incógnita.

Se ha descrito que la infección por micobacterias en macrófagos humanos y murinos altera la expresión de los miRNAs en el huésped, lo que desempeña un papel importante en el desarrollo de la infección. *Nocardia* y *Mycobacterium* pertenecen al orden Mycobacteriales, y se ha sugerido que comparten mecanismos en la formación de granulomas, probablemente debido a su cercanía filogenética, su naturaleza intracelular y a la similitud en componentes de la pared celular⁸⁴. Esta pared está compuesta por ácido meso-diaminopimérico y peptidoglicano unido a una cadena de D-galactano. Dicha cadena está ramificada con residuos de D-arabinofuranosil, empaquetados en ácidos micólicos, lo que aumenta el grosor de la pared celular. Estos ácidos micólicos contribuyen a la respuesta inflamatoria, destacando principalmente el dimicolato de trehalosa (TDM o factor cuerda), un importante factor de virulencia en *M. tuberculosis*, que fomenta la formación del granuloma⁸⁵. En conjunto, estos factores de virulencia modifican la respuesta inmune del huésped, así como la expresión génica celular.

Nuestro objetivo fue evaluar si la infección de macrófagos por *N. brasiliensis* alteraba la expresión de miRNAs implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria. Lo primero que realizamos fue la separación de PBMCs y purificación de monocitos de un grupo de donadores aparentemente sanos de sexo masculino, esto como primer abordaje y evitar sesgo por sexo; ya que existen diferencias en la respuesta de las células inmunes⁸⁶ y en la expresión de miRNAs ocasionadas por los cambios hormonales⁸⁷.

A los monocitos aislados se les evaluó la pureza y la viabilidad por citometría de flujo; donde se obtuvieron valores de pureza de 87% utilizando el marcador CD14, el cual es un marcador específico de monocitos clásicos⁸⁸. Sin embargo, no se tomó en consideración la población de monocitos no clásicos, que podrían corresponder al resto de la población aislada; para identificar dichas subpoblaciones sería necesario marcar con CD16 a las células⁸⁹. Respecto a la viabilidad, se utilizó Calcein Blue, un analito que se utiliza para medir la vitalidad metabólica de la célula y se obtuvieron valores de 97%, figura 12, lo cual es un valor aceptable según la literatura⁹⁰.

A las células purificadas se diferenciaron a MDMs por el método de adherencia⁹¹, se les evaluó la pureza con la determinación de la expresión de CD14+ y no encontramos diferencias significativas respecto a los monocitos, figura 13, lo cual era esperable y coincide con lo reportado en la literatura donde se comparó la expresión de CD14 de macrófagos diferenciados por adherencia mantienen niveles de expresión similares en comparación con los monocitos⁹².

Sin embargo, otros reportes han observado una reducción de la expresión de CD14 cuando los monocitos son diferenciados con citocinas como GM-CSF, lo cual no fue el caso en nuestros experimentos⁹³. También es importante destacar que se deben agregar otros marcadores como CD68 y CD206, para asegurar la diferenciación a macrófagos.

Además, se observaron cambios morfológicos en las células adherentes, lo cual coincide con reportes previos, donde las células modifican su morfología al adherirse a la placa, observando un aumento en el tamaño del citoplasma⁹⁴, un

aumento en granularidad al aumentar la cantidad de organelos⁹⁵ y tomando una forma irregular por su adherencia en la placa⁹⁶.

En cuanto a estudios que exploren la respuesta de los macrófagos humanos a infección con *Nocardia*, son muy escasos. En el trabajo de Liu y colaboradores se observó que, al infectar macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7, se incrementaban el número de vesículas, la presencia de bacterias intracelulares y el tamaño del citoplasma a largo del tiempo, visualizado mediante microscopía electrónica¹⁴. Estos cambios morfológicos también se han descrito en macrófagos infectados con micobacterias, donde se puede observar formación de vesículas⁹⁷ y el incremento del citoplasma⁹⁸.

En nuestro trabajo infectamos MDMs humanos con *N. brasiliensis* a una MOI de 10 por 2 y 20 horas y se corroboramos la infección de los MDMs mediante parámetros morfológicos, como el aumento del tamaño del citoplasma, la aparición de vesículas y la presencia de bacterias intracelulares, figura 13. No se observaron diferencias significativas en el tamaño de las células entre ambos tiempos, lo cual podría deberse a que los macrófagos fagocitan en un periodo que puede ir de minutos a horas⁹⁹. Tampoco se observó una diferencia apreciable en la aparición de vesículas ni en la presencia de bacterias intracelulares, aunque no se realizó una medición más fina por limitaciones del equipo de microscopio de luz.

Observamos que los MDMs infectados con *N. brasiliensis* adquirieron una morfología parecida a células espumosas, figura 14, como lo reportan Meester y colaboradores, quienes infectaron macrófagos derivados de médula ósea de ratón con *N. brasiliensis*. En dicho contexto, la formación de células espumosas favorece un aumento en la supervivencia de la bacteria¹⁰⁰, además de promover factores de transcripción como PPAR γ , el cual presenta una actividad antiinflamatoria importante¹⁰¹.

Los miRNAs desempeñan funciones fisiológicas reguladoras en procesos como la proliferación, la diferenciación celular y la respuesta inmune. Sin embargo, se ha reportado que, en infecciones con micobacterias, en macrófagos y

monocitos¹⁰², la expresión de los miRNAs se ve afectada, lo cual desempeña un papel importante en la resolución de dicha infección¹⁰³.

Este es el primer estudio en el que se evalúa la expresión de los miRNAs: miR-21, miR-26b y miR-29c en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* y se encontró un aumento en su expresión en comparación con las células no infectadas, figura 15.

MiR-21 se encuentra altamente expresado en células mieloides y ha surgido como un miRNA con funciones antiinflamatorias¹⁰⁴. En este trabajo lo evaluamos y encontramos un aumento de la expresión de miR-21 en MDMs humanos infectados *in vitro* con *N. brasiliensis*, donde nuestros resultados coinciden con lo reportado por Wu y colaboradores donde observaron que miR-21 se induce tras la infección con Bacillus Calmette-Guérin (BCG) mediante la activación de NF- κ B. También ellos reportan que la expresión de miR-21, disminuía la producción de IL-12, IL-6 y TNF al unirse al gen Il12p35, lo que deterioró las respuestas de las células T tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*⁶⁶. Además, miR-21 también promovió la apoptosis de las células dendríticas (DC) al dirigirse al gen Bcl2. Por consiguiente, miR-21 podría desempeñar un papel relevante en la modulación de la respuesta Th1 frente a micobacterias y podría estar relacionado a la respuesta adaptativa en la infección con *N. brasiliensis*.

En sentido opuesto a estos reportes, Xue y colaboradores revelan que la infección en la línea celular RAW264.7 por BCG, se relacionó con una regulación positiva de la vía de señalización TLR4/MyD88 aumentando la producción de citocinas proinflamatorias como TNF e IL-6 y además de un incremento en la apoptosis¹⁰⁵. En otro estudio, se reportó el aumento de la expresión de miR-21 en infección con *M. leprae* en monocitos humanos se observó una disminución de IL-1 β e IL-6, y un aumento de IL-10, acompañado de un aumento en la supervivencia de *M. tuberculosis* debido a la regulación de los genes CYP27B1 y IL1B relacionados a la formación del heterodímero TLR2/1⁶⁵. Estos cambios en la producción de citocinas están relacionados al proceso de infección de *N. brasiliensis* donde en el actinomicetoma se encuentra rodeado de células de

respuesta a citocinas como IL-4, IL-10, IL-6, IFN- γ y TGF- β dependiendo al estadio de la enfermedad¹³.

Por otra parte, se ha descrito que el aumento del metabolismo glucolítico es clave para la defensa del huésped contra infecciones con *M. tuberculosis*¹⁰⁶. En el trabajo de Hackett y colaboradores, reveló que en una infección por *M. tuberculosis* en MDMs humanos se indujo el aumento de la expresión de miR-21, lo que reprimió la glucólisis al regular la expresión de la isoforma muscular de la fosfofructocinasa (PFK-m), disminuyendo la producción de IL-1 β y favoreciendo el crecimiento bacteriano⁶⁷.

Por lo tanto, sugerimos que el papel de miR-21 en el contexto de la infección por *N. brasiliensis* probablemente esté relacionado con la regulación del proceso inflamatorio y con la inhibición de la respuesta Th1, necesaria para eliminar a este patógeno intracelular. Además, *N. brasiliensis* pudiera reprimir la glucólisis mediante la inducción de miR-21, sin embargo, aún queda por evaluar la producción de citocinas proinflamatorias, la actividad glucolítica y la interacción con la respuesta inmune.

Otro de los miRNAs que evaluamos durante la infección de MDMs por *N. brasiliensis* fue el miR-26b, el cual presentó un aumento de la expresión respecto a las células no infectadas, figura 15b, lo cual contradicen lo reportado por Li y colaboradores, donde observaron que en células THP-1 infectadas con *M. tuberculosis* existe una disminución de la expresión de miR-26b¹⁰⁷. Además, demostraron que miR-26b actúa como un regulador negativo de la vía de NF- κ B al regular el gen TAK1¹⁰⁸ lo que resulta en la inhibición de la respuesta inmune al disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y TNF. Esta discrepancia en los resultados puede deberse al tipo celular empleado, la cepa bacteriana, los tiempos de infección, entre otros.

De acuerdo con esto, nosotros sugerimos que el papel de miR-26b en el contexto de una infección por *N. brasiliensis* podría actuar en conjunto con miR-21 en la regulación de la respuesta inmune, inhibiendo la actividad proinflamatoria al afectar la producción de citocinas clave en la respuesta contra *N. brasiliensis*.

En cuanto a la expresión de miR-29c, también se encontró elevada su expresión figura 15c, contrario a lo esperado en nuestra hipótesis, pero es similar a lo que se tiene reportado un aumento de la expresión de miR-29c en sueros de pacientes con tuberculosis^{109,110} y en pacientes con lepra¹¹¹ esto relacionado a su uso como biomarcador de la enfermedad. Sin embargo, también existe discrepancia, pues en otro estudio no obtuvo diferencia significativa en la expresión de miR-29c en sueros de pacientes con Tb pulmonar activa a comparación de los sujetos sanos, sin embargo, este mismo estudio presentó que existe una diferencia entre la expresión de distintas poblaciones de continentes diferentes¹¹². Por otra parte, en otro estudio se analizó la expresión de la familia de miR-29 en células de ratones infectados con BCG, observando una disminución de la expresión relacionada con una mayor producción de IFN- γ ⁷¹.

Estos tipos de discrepancia se deben debido a que la expresión de miRNAs por distintos factores, desde factores experimentales como el tipo de muestra, el tipo de células y el patógeno empleado, a la variación epigenética que altere la biogénesis de los miRNA y esto ya afectar a nivel de expresión basal del miRNA¹¹³.

Por lo tanto, el papel de miR-29c en el contexto de la infección por *N. brasiliensis* podría estar relacionado con su presencia en el torrente sanguíneo y su potencial uso como biomarcador. No obstante, sería necesario desarrollar un panel específico para la detección de la infección, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad.

Una vez que evaluamos la expresión de los miRNAs *in vitro*, proseguimos a realizar un análisis *in silico* de los genes regulados por los miRNAs diferencialmente expresados y los relacionamos con el proceso de infección con micobacterias y con *N. brasiliensis*.

En cuanto el posible efecto de la expresión de los miRNAs en los genes regulados durante un proceso de infección se puede observar un efecto en distintos aspectos. En el caso de la posible participación de miR-21 en la regulación de

genes predictivos, encontramos 64 genes según las bases de datos utilizadas, figura 16. Destacan genes como STAT3, TIMP3, PDCD4, entre otros. La regulación de estos genes puede estar relacionados con la vía de señalización MAPK, la cual está relacionada en procesos como producción de citocinas, polarización y apoptosis celular. En el trabajo de Lu y colaboradores observaron el efecto de *M. tuberculosis* Rv1096 promoviendo la supervivencia bacteriana e inhibiendo la respuesta inflamatoria en macrófagos infectados¹¹⁴. La inhibición de la respuesta inflamatoria inducida por micobacterias en los macrófagos se debió, al menos en parte, al bloqueo de la activación de las vías de señalización NF- κ B y MAPK, debido a alteraciones en genes de TLR y NOD, los cuales se han visto afectados por la expresión de miR-21.

Otra vía posiblemente afectada sea la de la cascada de ERK1/ERK2, donde Li y colaboradores demostraron que la proteína Mce3E de *M. tuberculosis* inhibe la activación de la vía de señalización ERK1/2, lo que conduce a disminución de la producción de TNF e IL-6, promoviendo la supervivencia bacteriana dentro del macrófago¹¹⁵. El gen de esta proteína se encuentra también en el genoma de *N. brasiliensis*, sin embargo, no está reportada su expresión o posible participación tanto en la virulencia de la bacteria, como en el efecto de la respuesta inmune.

Por lo anterior podemos sugerir que durante la infección por *N. brasiliensis*, miR-21 regula procesos que impiden la activación correcta de los macrófagos, disminuyendo su respuesta inmune y favoreciendo la supervivencia bacteriana.

Para el caso de miR-26b, figura 17, las vías que estén posiblemente afectadas por la regulación de los genes predichos serían vías de modificación de proteínas, de metabolismo de nitrógeno y del proceso metabólico celular, las cuales son vías muy generales que aplican a muchos tipos celulares y que son esenciales en el desarrollo y activación de los macrófagos^{116–118}.

Por otra parte, los posibles genes regulados por miR-29c, figura 18, se observaron con una alta participación en procesos de remodelación de la matriz extracelular, lo cual tiene mucha relación con la formación del micetoma, pues ya

se ha reportado la participación de metaloproteinasas de matriz 9 en la lesión¹¹⁹. Faltaría comprobar la expresión de miR-29c en tejido infectado de micetoma.

Para complementar estos resultados se hizo el análisis de los genes que estuvieran validados experimentalmente, observando una fuerte regulación en el metabolismo y biosíntesis de ácidos grasos, figura 19, lo que puede estar relacionado a la formación de células espumosas que se ha observado en infecciones con *M. tuberculosis*¹²⁰ y con *N. brasiliensis*⁷⁴. También se observó un enriquecimiento en la vía de señalización de TGF- β , el cual tiene una participación en la supervivencia intracelular en infección con *M. tuberculosis* en monocitos¹²¹. Otra de las vías que se vio enriquecida fue la de FoxO que se ha reportado su participación en la polarización y la producción de IL-10 en un proceso de infección con micobacterias¹²². Esta vía también está muy relacionada con la vía de PI3K y también se vio enriquecida, afectando en la activación del macrófago y la polarización en homeostasia¹²³ y en infección con *M. tuberculosis*¹²⁴. Otra de las vías enriquecidas es la vía de p53 la cual aparte de su relación con la apoptosis¹²⁵, se relaciona con la supervivencia intracelular de las micobacterias en macrófagos¹²⁶

Por último, para ver cómo se vieron alteradas vías de la respuesta inmune, se seleccionaron 18 vías que estuvieran relacionadas en una infección intracelular. Se realizó la comparación con los genes que están diferencialmente expresados en un proceso de infección con *M. tuberculosis* y se analizaron cuáles fueron las vías enriquecidas. De estas las que vieron genes sobreexpresados fueron de señalización a múltiples citocinas como TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-10, relacionadas a una defensa adecuada. En el caso contrario de las vías subexpresadas se observaron algunas como procesos de glucólisis, metabolismo de ácidos grasos, maduración del fagosoma y fagocitosis, esto debido al efecto que tiene *M. tuberculosis* en la inhibición de la fagocitosis.

También se buscó las coincidencias entre genes regulados por cada miRNA que compartiera con genes de cada vía. De estos se obtuvieron 12 genes regulados por miR-21, 15 genes regulados por miR-26b y 17 genes regulados por miR-29c.

De los genes regulados por miR-21 cabe señalar el efecto de algunos en específico como CCL1 y CCL20 (que también fueron genes sobreexpresados en infección con *M. tuberculosis*) las cuales son quimiocinas asociadas a la respuesta Th2 y Th17 respectivamente, y de las cuales se ha reportada una importante participación en infección con *M. tuberculosis*¹²⁷ y en *N. brasiliensis*¹²⁸, y ambos tienen relación con STAT3, que es otro gen regulado por miR-21. Otro gen regulado por miR-21 y de importancia en la infección con *M. tuberculosis* es FASLG el cual está relacionado con la apoptosis.

En cuanto a genes de relevancia regulados por miR-26b son PTEN y PRKCD, los cuales son genes muy relevantes en la regulación tanto positiva como negativa de la apoptosis, con una alta participación en la infección de *M. tuberculosis* como inhibidores del crecimiento bacteriano.

Y sobre los genes de relevancia regulados por miR-29c se encuentran TRAF4 y TNFRSF1A que participan en la vía de señalización de TNF y la vía de señalización de NF-κB, los cuales se ven afectadas en infecciones, sobre todo en infecciones intracelulares como con *M. tuberculosis*⁶⁹.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIÓN

La expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c esta aumentado en macrófagos infectados con *N. brasiliensis*, los cuales pueden tener un efecto sobre la regulación de la respuesta inflamatoria, metabólica y en el control de la infección.

CAPÍTULO X

PERSPECTIVAS

- Realizar infección de macrófagos con otra bacteria intracelular y medir la expresión de miR-21, miR-26b y miR-29c a diferentes tiempos.
- Realizar tinción de rojo oleoso de los macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.
- Análisis de la expresión de genes regulados por cada miRNA como CCL1, CCL20, STAT3, IL12A, PTEN, TRAF4.
- Validar los efectos de los cambios de expresión de los miRNA y relacionarlos con cambios de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune.
- Correlacionar la expresión de los miRNAs con las funciones microbicidas de los macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO XI

LIMITANTES

- La expresión de los miRNAs se evaluó en un único punto temporal, lo cual limita el análisis de su dinámica durante el curso de la infección.
- El análisis se limitó a solo tres miRNAs, por lo que es posible la participación de otros miRNAs en la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*.
- La literatura es heterogénea y los datos deben ser comparados con cierta consideración al no ser un modelo igual.
- El tamaño de la muestra fue reducido al ser un estudio exploratorio sobre la regulación de la respuesta inmune en la infección por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO XII

BIBLIOGRAFÍA

1. Duggal SD, Chugh T Das. Nocardiosis: A Neglected Disease. *Medical Principles and Practice*. 2020;29(6):514-523. doi:10.1159/000508717
2. Micetoma. WHO. January 14, 2022. Accessed March 3, 2025. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycetoma>
3. Emery D, Denning DW. The global distribution of actinomycetoma and eumycetoma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(9):1-13. doi:10.1371/journal.pntd.0008397
4. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, et al. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos ARTÍCULO DE INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA. *Gac Med Mex*. 2013;(149):586-592.
5. Cardenas-De la Garza JA, Welsh O, Cuellar-Barboza A, et al. Climate, soil type, and geographic distribution of actinomycetoma cases in Northeast Mexico: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2020;15(5). doi:10.1371/journal.pone.0232556
6. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):259-282. doi:10.1128/CMR.19.2.259-282.2006
7. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, et al. Evaluation of matrix-Assisted laser desorption ionization-Time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and other

- aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol*. 2016;54(2):376-384.
doi:10.1128/JCM.02128-15
8. Salinas-Carmona MC, Castro-Corona M de los Á, Licón-Trillo Á. Mecanismos de patogenicidad de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. *Medicina Universitaria*. 2002;4(15):97-101.
 9. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Ocampo-Candiani J. Complete Genome Sequence Analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 Reveals a Saprobic Lifestyle and the Genes Needed for Human Pathogenesis. *PLoS One*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0065425
 10. Engelbrecht A, Saad H, Gross H, Kaysser L. Natural Products from *Nocardia* and Their Role in Pathogenicity. *Microb Physiol*. 2021;31(3):217-232. doi:10.1159/000516864
 11. Méndez-Tovar LJ, Mondragón-González R, Vega-López F, et al. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia*. 2004;(158):407-414.
 12. Mangieri NA, Guevara Nuñez D, Echavarría G, et al. Sporotrichoid nocardiosis by *Nocardia brasiliensis*. *Rev Argent Microbiol*. 2021;53(1):43-47. doi:10.1016/j.ram.2020.06.007
 13. Solis-Soto JM, Quintanilla-Rodríguez LE, Meester I, Segoviano-Ramírez JC, Vazquez-Juarez JL, Salinas Carmona MC. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol Histopathol*. 2008;(23):573-581.
 14. Liu W, Deng Y, Tan A, et al. Intracellular behavior of *Nocardia seriolae* and its apoptotic effect on RAW264.7 macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1138422
 15. Gonzalez-Carrillo C, Millan-Sauceda C, Lozano-Garza HG, et al. Genomic changes associated with the loss of *Nocardia brasiliensis* virulence in mice

- after 200 In Vitro passages. *Infect Immun*. 2016;84(9):2595-2606.
doi:10.1128/IAI.00329-16
16. Murphy KP. *Janeway's Immunobiology*. Eighth Edition. (Scobie J, Lawrence E, Moldovan I, Goatly B, eds.). Garland Science; 2012.
 17. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5.
doi:10.3389/fimmu.2014.00514
 18. Gharavi AT, Hanjani NA, Movahed E, Doroudian M. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. *Cell Mol Biol Lett*. 2022;27(1). doi:10.1186/s11658-022-00384-y
 19. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Eighth Edition. Elsevier Saunders; 2015.
 20. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020;877. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090
 21. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2(1). doi:10.1186/2050-7771-2-1
 22. Jin X, Kruth HS. Culture of macrophage colony-stimulating factor differentiated human monocyte-derived macrophages. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;2016(112). doi:10.3791/54244
 23. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*. 2016;100(3):481-489. doi:10.1189/jlb.3ru0316-144r
 24. Bender AT, Ostenson CL, Giordano D, Beavo JA. Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in

- cGMP phosphodiesterase expression. *Cell Signal*. 2004;16(3):365-374.
doi:10.1016/j.cellsig.2003.08.009
25. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17253-17258. doi:10.1073/pnas.1308887110
 26. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R, et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? *Clin Sci*. 2023;137(15):1067-1093.
doi:10.1042/CS20220531
 27. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Front Immunol*. 2019;10(MAY).
doi:10.3389/fimmu.2019.01084
 28. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol*. 2013;34(5):216-223.
doi:10.1016/j.it.2012.11.001
 29. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2024;25(3):211-232. doi:10.1038/s41576-023-00662-1
 30. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(AUG). doi:10.3389/fendo.2018.00402
 31. Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan GC. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response. *Shock*. 2016;46(2):122-131.
doi:10.1097/SHK.0000000000000604
 32. Yang T, Ge B. miRNAs in immune responses to Mycobacterium tuberculosis infection. *Cancer Lett*. 2018;431:22-30.
doi:10.1016/j.canlet.2018.05.028

33. Christopher A, Kaur R, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res.* 2016;7(2):68. doi:10.4103/2229-3485.179431
34. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):21-37. doi:10.1038/s41580-018-0045-7
35. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. microRNAs are ligands of Toll-like receptors. *RNA.* 2013;19(6):737-739. doi:10.1261/rna.036319.112
36. Yin Z, Han Z, Hu T, et al. Neuron-derived exosomes with high miR-21-5p expression promoted polarization of M1 microglia in culture. *Brain Behav Immun.* 2020;83:270-282. doi:10.1016/j.bbi.2019.11.004
37. Cui X, Meng H, Li M, Chen X, Yuan D, Wu C. Exosomal Small RNA Sequencing Profiles in Plasma from Subjects with Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *Microorganisms.* 2024;12(7). doi:10.3390/microorganisms12071417
38. Mirzaei R, Babakhani S, Ajourloo P, et al. The emerging role of exosomal miRNAs as a diagnostic and therapeutic biomarker in Mycobacterium tuberculosis infection. *Molecular Medicine.* 2021;27(1). doi:10.1186/s10020-021-00296-1
39. Mukhtar F, Guarnieri A, Brancazio N, et al. The role of Mycobacterium tuberculosis exosomal miRNAs in host pathogen cross-talk as diagnostic and therapeutic biomarkers. *Front Microbiol.* 2024;15. doi:10.3389/fmicb.2024.1441781
40. Larabi A, Dalmasso G, Delmas J, Barnich N, Nguyen HTT. Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli. *Gut Microbes.* 2020;11(6):1677-1694. doi:10.1080/19490976.2020.1771985
41. Tan H, Li Y, Li J, Wang K, Xiao Y, Xiao CY. The Mechanism of miR-29 in Bladder Cancer Released by Exosomes into Brain Microglia to Promote

- M2 Polarization and Angiogenesis in Brain Metastasis of Bladder Cancer. *Alternative Therapies*. 2024;30(12).
42. Milhelm Z, Chiroi P, Harangus A, et al. Understanding microRNAs in the context of bacterial versus viral infections. *Med Pharm Rep*. 2024;97(4):438-445. doi:10.15386/mpr-2817
 43. Sheedy FJ, Palsson-Mcdermott E, Hennessey EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 2010;11(2):141-147. doi:10.1038/ni.1828
 44. Girardi E, López P, Pfeffer S. On the importance of host MicroRNAs during viral infection. *Front Genet*. 2018;9(OCT). doi:10.3389/fgene.2018.00439
 45. Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol*. 2013;15(9):1496-1507. doi:10.1111/cmi.12159
 46. Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol*. 2013;15(9):1496-1507. doi:10.1111/cmi.12159
 47. Eulalio A, Schulte LN, Vogt J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol*. 2012;9(6):742-750. doi:10.4161/rna.20018
 48. Leon-Icaza SA, Zeng M, Rosas-Taraco AG. MicroRNAs in viral acute respiratory infections: Immune regulation, biomarkers, therapy, and vaccines. *ExRNA*. 2019;1(February-March). doi:10.1186/s41544-018-0004-7
 49. Das K, Garnica O, Dhandayuthapani S. Modulation of host miRNAs by intracellular bacterial pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6(AUG). doi:10.3389/fcimb.2016.00079
 50. Ruiz-Tagle C, Naves R, Balcells ME. Unraveling the Role of MicroRNAs in Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease: Advances and Pitfalls. *Infect Immun*. 2020;88(3). doi:10.1128/IAI

51. Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, et al. MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity*. 2011;35(2):169-181. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.009
52. Bettencourt P, Pires D, Anes E. Immunomodulating microRNAs of mycobacterial infections. *Tuberculosis*. 2016;97:1-7. doi:10.1016/j.tube.2015.12.004
53. Furci L, Schena E, Miotto P, Cirillo DM. Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with Mycobacterium tuberculosis. *Int J Mycobacteriol*. 2013;2(3):128-134. doi:10.1016/j.ijmyco.2013.04.006
54. Wu Z, Lu H, Sheng J, Li L. Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. *FEBS Lett*. 2012;586(16):2459-2467. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.004
55. Ni B, Rajaram MVS, Lafuse WP, Landes MB, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* Decreases Human Macrophage IFN- γ Responsiveness through miR-132 and miR-26a. *The Journal of Immunology*. 2014;193(9):4537-4547. doi:10.4049/jimmunol.1400124
56. Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, et al. MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity*. 2011;35(2):169-181. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.009
57. 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(41). doi:10.1073/pnas.1608255113
58. Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, et al. MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*. 2015;95(3):246-250. doi:10.1016/j.tube.2015.03.006

59. Wei J, Huang X, Zhang Z, et al. MyD88 as a target of microRNA-203 in regulation of lipopolysaccharide or Bacille Calmette-Guerin induced inflammatory response of macrophage RAW264.7 cells. *Mol Immunol*. 2013;55(3-4):303-309. doi:10.1016/j.molimm.2013.03.004
60. Singh Y, Kaul V, Mehra A, et al. Mycobacterium tuberculosis Controls MicroRNA-99b (miR-99b) Expression in Infected Murine Dendritic Cells to Modulate Host Immunity. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(7):5056-5061. doi:10.1074/jbc.C112.439778
61. Xu G, Zhang Z, Xing Y, et al. MicroRNA-149 Negatively Regulates TLR-Triggered Inflammatory Response in Macrophages by Targeting MyD88. *J Cell Biochem*. 2014;115(5):919-927. doi:10.1002/jcb.24734
62. Kumar M, Sahu SK, Kumar R, et al. 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*. 2015;17(3):345-356. doi:10.1016/j.chom.2015.01.007
63. Lou J, Wang Y, Zhang Z, Qiu W. MiR-20b inhibits mycobacterium tuberculosis induced inflammation in the lung of mice through targeting NLRP3. *Exp Cell Res*. 2017;358(2):120-128. doi:10.1016/j.yexcr.2017.06.007
64. Liu PT, Wheelwright M, Teles R, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med*. 2012;18(2):267-273. doi:10.1038/nm.2584
65. Wu Z, Lu H, Sheng J, Li L. Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. *FEBS Lett*. 2012;586(16):2459-2467. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.004
66. Hackett EE, Charles-Messance H, O'Leary SM, et al. Mycobacterium tuberculosis Limits Host Glycolysis and IL-1 β by Restriction of PFK-M via MicroRNA-21. *Cell Rep*. 2020;30(1):124-136.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.015

67. Vegh P, Magee DA, Nalpas NC, et al. MicroRNA profiling of the bovine alveolar macrophage response to *Mycobacterium bovis* infection suggests pathogen survival is enhanced by microRNA regulation of endocytosis and lysosome trafficking. *Tuberculosis*. 2015;95(1):60-67. doi:10.1016/j.tube.2014.10.011
68. Wang Q, Liu S, Tang Y, Liu Q, Yao Y. MPT64 protein from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits apoptosis of macrophages through NF- κ B-miRNA21-Bcl-2 pathway. *PLoS One*. 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0100949
69. Ni B, Rajaram MVS, Lafuse WP, Landes MB, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* Decreases Human Macrophage IFN- γ Responsiveness through miR-132 and miR-26a. *The Journal of Immunology*. 2014;193(9):4537-4547. doi:10.4049/jimmunol.1400124
70. Ma F, Xu S, Liu X, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat Immunol*. 2011;12(9):861-869. doi:10.1038/ni.2073
71. Trevino-Villarreal JH, Vera-Cabrera L, Valero-Guillén PL, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2012;80(10):3587-3601. doi:10.1128/IAI.00446-12
72. Vazquez-Marmolejo A V., Lopez-Lopez N, Ascacio-Martinez JA, Valadez-Calderon JG, Espinoza-Martinez PE, Salinas-Carmona MC. Nitric oxide determines the development of actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* in eNOS knockout C57BL/6 mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2021;368(8). doi:10.1093/femsle/fnab048
73. Meester I, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* induces formation of foamy macrophages and dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2014;9(6). doi:10.1371/journal.pone.0100064

74. Meester I, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC. Retnla down-regulation and IL-13-rich environment correlate with inflammation severity in experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Pathog Dis*. 2013;67(3):214-220. doi:10.1111/2049-632X.12036
75. Shim D, Kim H, Shin SJ. Mycobacterium tuberculosis Infection-Driven Foamy Macrophages and Their Implications in Tuberculosis Control as Targets for Host-Directed Therapy. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00910
76. 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
77. Díaz-Piedra P, Olay-Fuentes G, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. 2012;59(4):243-250. <http://www.medigraphic.com/>
78. Salinas-Carmona MC, Zúñiga JM, Pérez-Rivera LI, Segoviano-Ramírez JC, Vázquez-Marmolejo A V. *Nocardia brasiliensis* modulates IFN-, IL-10, and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c mice. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(5):263-271. doi:10.1089/jir.2008.0059
79. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*. 2012;80(1):75-84. doi:10.1007/s11103-012-9885-2
80. Lavalett L, Ortega H, Barrera LF. Infection of Monocytes From Tuberculosis Patients With Two Virulent Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Alterations in Myeloid Effector Functions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.00163

81. Castro-Matteotti B, Vera-Cabrera L, Ocampo-Candiani J, Rendón A, Salinas-Carmona MC, Welsh O. Immune response to *Nocardia brasiliensis* extracellular antigens in patients with mycetoma. *Mycopathologia*. 2008;165(3):127-134. doi:10.1007/s11046-008-9093-4
82. Gonzalez-Suarez ML, Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;57(1):17-24. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00575.x
83. Mejía-Torres M, Coronado-Rodríguez F, Franco-Marquez R, Salinas-Carmona MC. Cutaneous nocardiosis and cutaneous tuberculosis induce similar expression of inflammation-related markers in human skin granulomatous infections. *Revista Medicina Universitaria*. 2024;26(3). doi:10.24875/rmu.24000008
84. Daffé M, Marrakchi H. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4). doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0027-2018
85. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626-638. doi:10.1038/nri.2016.90
86. Sharma S, Eghbali M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biol Sex Differ*. 2014;5(1). doi:10.1186/2042-6410-5-3
87. Ziegler-Heibrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993;14(3):121-125.
88. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2019;10(AUG). doi:10.3389/fimmu.2019.02035
89. Figueroa G, Parira T, Laverde A, et al. Characterization of human monocyte-derived dendritic cells by imaging flow cytometry: A comparison

between two monocyte isolation protocols. *Journal of Visualized Experiments*. 2016;2016(116). doi:10.3791/54296

90. Meisel SR, Xu XP, Edgington TS, et al. Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity. *Atherosclerosis*. 2002;161:35-43. www.elsevier.com/locate/atherosclerosis
91. Wintergerst ES, Jelk J, Asmis R. Differential expression of CD14, CD36 and the LDL receptor on human monocyte-derived macrophages. *Histochem Cell Biol*. 1998;110:231-241.
92. Kittan NA, Allen RM, Dhaliwal A, et al. Cytokine Induced Phenotypic and Epigenetic Signatures Are Key to Establishing Specific Macrophage Phenotypes. *PLoS One*. 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0078045
93. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016;430:64-70. doi:10.1016/j.jim.2016.01.012
94. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008668
95. Baxter EW, Graham AE, Re NA, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. 2020;478. doi:10.1016/j.jim.2019.112721
96. D'arcy Hart P, Armstrong JA, Brown CA, Draper P. *Ultrastructural Study of the Behavior of Macrophages Toward Parasitic Mycobacteria*. Vol 5.; 1972. <https://journals.asm.org/journal/iai>

97. K Ha DK, Gardner D, M Lawton JW. *Macrophage Function in Mycobacterium Lepraemurium Infection: Morphological and Functional Changes of Peritoneal and Splenic Macrophages In Vitro*. Vol 39.; 1983. <https://journals.asm.org/journal/iai>
98. Changyu Yeo J, Alexander Wall A, Lea Stow J, Ahti Hamilton N. High-throughput quantification of early stages of phagocytosis. *Biotechniques*. 2013;55(3):115-124. doi:10.2144/000114075
99. Mahajan S, Dkhar HK, Chandra V, et al. Mycobacterium tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR γ and TR4 for Survival . *The Journal of Immunology*. 2012;188(11):5593-5603. doi:10.4049/jimmunol.1103038
100. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. International union of pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):726-741. doi:10.1124/pr.58.4.5
101. Agarwal RG, Sharma P, Nyati KK. microRNAs in mycobacterial infection: Modulation of host immune response and apoptotic pathways. *Immune Netw*. 2019;19(5). doi:10.4110/in.2019.19.e30
102. Wang L, Xiong Y, Fu B, et al. MicroRNAs as immune regulators and biomarkers in tuberculosis. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.1027472
103. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol*. 2015;6(JAN). doi:10.3389/fimmu.2015.00019
104. Xue X, Qiu Y, Yang HL. Immunoregulatory role of MicroRNA-21 in macrophages in response to bacillus calmette-guerin infection involves modulation of the TLR4/MyD88 signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;42(1):91-102. doi:10.1159/000477118

105. Osada-Oka M, Goda N, Saiga H, et al. Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for Mycobacterium tuberculosis infection. *Int Immunol*. 2019;31(12):781-793. doi:10.1093/intimm/dxz048
106. Bade P, Simonetti F, Sans S, et al. Integrative Analysis of Human Macrophage Inflammatory Response Related to Mycobacterium tuberculosis Virulence. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.668060
107. Li H, Wang Y, Song Y. 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. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(3):1218-1227. www.ijcep.com/
108. Zhang X, Guo J, Fan S, et al. Screening and identification of six serum microRNAs As novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis. *PLoS One*. 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0081076
109. He J, Xiong J, Huang Y. miR-29 as diagnostic biomarkers for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Front Public Health*. 2024;12. doi:10.3389/fpubh.2024.1384510
110. Jorge KTOS, Souza RP, Assis MTA, et al. Characterization of MicroRNA Expression Profiles and Identification of Potential Biomarkers in Leprosy. *J Clin Microbiol*. 2017;55(5):1516-1525. doi:10.1128/JCM
111. Miotto P, Mwangoka G, Valente IC, et al. MiRNA signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2013;8(11). doi:10.1371/journal.pone.0080149
112. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS Journal*. 2011;278(10):1598-1609. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x

113. Lu Q, Zhang W, Fang J, Zheng J, Dong C, Xiong S. Mycobacterium tuberculosis Rv1096, facilitates mycobacterial survival by modulating the NF- κ B/MAPK pathway as peptidoglycan N-deacetylase. *Mol Immunol*. 2020;127:47-55. doi:10.1016/j.molimm.2020.08.005
114. Li J, Chai QY, Zhang Y, et al. Mycobacterium tuberculosis Mce3E Suppresses Host Innate Immune Responses by Targeting ERK1/2 Signaling . *The Journal of Immunology*. 2015;194(8):3756-3767. doi:10.4049/jimmunol.1402679
115. Richardson ET, Shukla S, Nagy N, et al. ERK signaling is essential for macrophage development. *PLoS One*. 2015;10(10). doi:10.1371/journal.pone.0140064
116. Linton MF, Moslehi JJ, Babaev VR. Akt signaling in macrophage polarization, survival, and atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11). doi:10.3390/ijms20112703
117. Rao KMK. MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):3-10. doi:10.1189/jlb.69.1.3
118. Geneugelijk K, Kloezen W, Fahal AH, van de Sande WWJ. Active Matrix Metalloprotease-9 Is Associated with the Collagen Capsule Surrounding the *Mycetozoa* Grain in Mycetoma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3). doi:10.1371/journal.pntd.0002754
119. Singh V, Jamwal S, Jain R, Verma P, Gokhale R, Rao KVS. Mycobacterium tuberculosis-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):669-681. doi:10.1016/j.chom.2012.09.012
120. Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. *Enhancement of Intracellular Growth of Mycobacterium Tuberculosis in Human Monocytes by Transforming Growth Factor-d.l.*; 1994. <http://jid.oxfordjournals.org/>

121. Bouzeyen R, Haoues M, Barbouche MR, Singh R, Essafi M. FOXO3 Transcription Factor Regulates IL-10 Expression in Mycobacteria-Infected Macrophages, Tuning Their Polarization and the Subsequent Adaptive Immune Response. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02922
122. Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology.* 2017;198(3):1006-1014. doi:10.4049/jimmunol.1601515
123. Sha S, Shi Y, Tang Y, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1987 protein induces M2 polarization of macrophages through activating the PI3K/Akt1/mTOR signaling pathway. *Immunol Cell Biol.* 2021;99(6):570-585. doi:10.1111/imcb.12436
124. Lowe JM, Menendez D, Bushel PR, et al. P53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res.* 2014;74(8):2182-2192. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1070
125. Lim YJ, Lee J, Choi JA, et al. M1 macrophage dependent-p53 regulates the intracellular survival of mycobacteria. *Apoptosis.* 2020;25(1-2):42-55. doi:10.1007/s10495-019-01578-0
126. Abebe F. Synergy between Th1 and Th2 responses during Mycobacterium tuberculosis infection: A review of current understanding. *Int Rev Immunol.* 2019;38(4):172-179. doi:10.1080/08830185.2019.1632842
127. Rosas-Taraco AG, Perez-Liñan AR, Bocanegra-Ibarias P, Perez-Rivera LI, Salinas-Carmona MC. Nocardia brasiliensis induces an immunosuppressive microenvironment that favors chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2012;80(7):2493-2499. doi:10.1128/IAI.06307-11