



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

miARNs EXOSOMALES COMO BIOMARCADORES DE
EFICACIA A TRATAMIENTO EN PACIENTES CON
TUBERCULOSIS PULMONAR FARMACORRESISTENTE Y SU
COMORBILIDAD CON DIABETES MELLITUS TIPO 2.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGA
P R E S E N T A:

GARDUÑO TORRES ANA ELENA



DIRECTOR DE TESIS:
GONZÁLEZ HERNÁNDEZ YOLANDA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS, CDMX 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Garduño
Torres
Ana Elena
5537134730
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
315169528

2. Datos del tutor

Dra.
Yolanda
González
Hernández

3. Datos del sinodal 1.

Dr. Victor Julián
Valdés
Rodríguez

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis Horacio
Gutiérrez
González

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Ricardo
Valle
Ríos

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Augusto
González
Canto

7. Datos del trabajo escrito

miARNs exosomales como biomarcadores de eficacia a tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar farmacorresistente y su comorbilidad con diabetes mellitus tipo 2.
96 páginas
2022

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias por darme la oportunidad de tener una educación universitaria y enseñarme lo bonito que es la biología.

A todos los profesores y amigos que conocí en la carrera por brindarme su apoyo y sabiduría, que fueron esenciales para mi desarrollo personal y académico.

Al Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por aceptarme como parte del grupo.

A la Dra. Yolanda González Hernández por todo el conocimiento compartido, apoyo, paciencia, dedicación que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales, el Dr. Luis Horacio Gutiérrez González, Dr. Augusto José González Canto, Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez y el Dr. Ricardo Valles Ríos por su tiempo brindado en la revisión de mi trabajo, sus observaciones y correcciones.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá por el apoyo y amor que me ha brindado durante toda mi vida, por estar en las buenas y las malas.

A mi gemela, mi mejor amiga y confidente que estará en todos los logros y derrotas, por estar toda la vida a lado de mí, riendo, peleando y apoyándome en todo lo necesario.

A mi abuelo, por su amor inmenso e incondicional que me da brindado toda mi vida, por todas sus enseñanzas que me formaron como persona.

Dedico con todo mi corazón esta tesis a mi abuela, sin ella no lo hubiera logrado, aunque ya no está físicamente, todos los días está presente en mi corazón. Seguirá siendo el pilar de la familia, por siempre. Por brindarme su apoyo incondicional, su amor infinito y su vida...

“Nada nos puede derrotar”

-Los abuelos

-	ÍNDICE GENERAL	
1.	Abreviaturas	7
2.	Resumen	9
3.	Antecedentes	10
3.1.	Definición	11
3.2.	Agente causal	11
3.3.	Fisiopatología	12
3.4.	Epidemiología	12
3.5.	Tuberculosis farmacorresistente	13
3.5.1.	Diagnóstico	17
3.5.2.	Tratamiento	17
3.5.3.	TB-MFR, diagnóstico y comorbilidad	22
3.6.	Comorbilidades	23
3.6.1.	Diabetes mellitus tipo 2	23
3.7.	Biomarcadores	27
3.7.1.	Exosomas	29
3.7.2.	Exosomas y <i>M. tuberculosis</i>	32
3.7.3.	Micro RNAs (miARNs)	33
3.7.4.	miRNAs y <i>M. tuberculosis</i>	34
4.	Pregunta de investigación	35
5.	Justificación	36
6.	Hipótesis	36
7.	Objetivos	37
7.1.	Objetivo general	37
7.2.	Objetivos particulares	37
8.	Métodos	37
8.1.	Grupo de estudio	37
8.2.	Aislamiento de exosomas	38
8.3.	Extracción de mRNA exosomales	39
8.4.	Perfil de expresión de miARNs exosomales	40
8.5.	Evaluación de la expresión de miARNs exosomales a partir de	41

una matriz exploratoria	
8.6. Evaluación de la expresión de miARNs endógenos	41
8.7. Evaluación de la expresión de 190 miARNs	41
8.8. Evaluación individual de miARNs en pacientes con TB-MFR a partir de una matriz exploratoria	42
8.9. Análisis de datos	43
8.10. Análisis estadístico	43
9. Resultados	
9.1. Descripción del grupo de estudio	45
9.2. Descripción de miARNs endógenos	47
9.3. Selección de miARNs expresados en T0 y T12 en pacientes con TB-MFR	49
9.4. Selección final de miARNs expresados en T0 y T12	52
9.5. Evaluación individual de miARNs diferencialmente expresados en pacientes con TB-MFR y sujetos sanos	53
10. Discusión de resultados	62
11. Conclusión	64
12. Referencias	65
13. Anexos	79

1 Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AMX	Amoxicilina
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
Cs	Cicloserina
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DOTS	Tratamiento bajo Observación Directa
E	Etambutol
DST	Prueba de susceptibilidad a fármacos
EPTB	Tuberculosis extrapulmonar
ETO	Etionamida
FID	Federación Internacional de Diabetes
H	Isoniazida
IL6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
KM	Kanamicina
LFX	Levofloxacina
LTBI	Infección tuberculosa latente
MVB	Cuerpo multivesicular
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Micobacterium tuberculosis</i>
miARNs	Micro RNAs
MXF	Moxifloxacina
OFX	Ofloxacino
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Ácido para-aminosalicílico
pre-XDR-TB	TB causada multirresistente y resistente a rifampicina (MDR/RR-TB) y que además son resistentes a cualquier fluoroquinolona.
PTO	Protionamida
R	Rifampicina
RR-TB	Rifampicina/Multidrogorresistente
RFB	Rifabutina
RPT	Rifapentina

S	Estreptomicina
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis multifármacorresistente
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR-TB	tuberculosis extremadamente resistente

2 Resumen

La falta de un biomarcador para el seguimiento del tratamiento o recaída en pacientes con TB-MFR (tuberculosis multifármacorresistente) ha contribuido a la aparición de cepas con resistencia extendida, por lo cual los biomarcadores basados en miARN del hospedero, evaluados en vesículas extracelulares/exosomas (EVs), son una alternativa de seguimiento para la TB-MFR. Se analizaron la EVs extraídas del suero de 26 pacientes con TB resistente a los medicamentos (DR-TB) y 16 sujetos sanos. Se aislaron los miARNs totales de los EVs y se amplificó un panel de 180 miARNs, utilizando un pool de ARN total de cinco pacientes antes del tratamiento y otro pool de ARN total los mismos pacientes a los 12 meses del tratamiento. Los miARNs se analizaron y se seleccionaron seis miARNs, tres expresados únicamente antes del tratamiento y tres expresados solo a los 12 meses del tratamiento. La validación de la expresión de los seis miARNs se realizó de manera individual en cada paciente y a cada tiempo de tratamiento. Se observó una expresión al alza de **miR-let-7e-5p** al término del tratamiento (9-12), mientras que el **miR-hsa-195-5p** se encuentra con una expresión al alza al momento del cultivo negativo T(3-5). Se proponen ambos miARNs como un indicador de falla del tratamiento o tiempo de recaída después de que se completó el tratamiento, lo que permitirá realizar ajustes en los regímenes terapéuticos.

3 Antecedentes

3.1 *M. tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa transmitida vía aérea causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). *M. tuberculosis*, es el miembro más conocido e importante para el ser humano del *Mycobacterium*, donde se encuentran especies como: *M.bovis*, *M. caprae*, *M.canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* y *M. mungi*. (Russell, 2001) El bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* entra por la vía aérea y llega a los pulmones iniciando una infección pulmonar. Aunque también puede migrar del pulmón hacia otros órganos e infectar otros tejidos como cerebro, hígado, hueso, riñones, etc., causando una tuberculosis extrapulmonar (EPTB). (Sunnetcioglu et al., 2015). El pulmón es el órgano más comúnmente afectado por *M. tuberculosis* en el hospedero inmunocompetente, con estimaciones de la afectación pulmonar en sujetos con tuberculosis activa de 79 a 87% (Ravimohan et al., 2018). Sin embargo, en los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen más posibilidades de tener tuberculosis extrapulmonar (Razanamparany et al., 2002) (Ayyappan et al., 2019) (Russell, 2001)

Clínicamente la TB pulmonar activa se representa con signos y síntomas característicos: tos crónica productiva o en los casos más graves sanguinolenta, dificultad respiratoria, dolor torácico. Pérdida de peso, fiebre y diaforesis nocturna (sudoraciones nocturnas) (Caminero Luna, 2003). La TB es una enfermedad prevalente en países en desarrollo y en condiciones de pobreza. Condiciones como la desnutrición, diabetes mellitus e infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) incrementa el riesgo de enfermar por TB, entre otras (JW et al., 2016)

El tratamiento convencional para la TB farmacosensible se caracteriza por la administración de cuatro antibióticos (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol) por periodos de hasta 24 meses (OMS, 2020). La duración del tratamiento incrementa al detectarse resistencia a alguno de los medicamentos de

primera línea, requiriendo la administración de fármacos de mayor complejidad y difícil acceso.

3.2 Agente causal

Las micobacterias pertenecen al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, orden Actinomycetales, suborden Corynebacterineae, familia Mycobacteriaceae, género Mycobacterium. Son bacilos aerobios obligados, inmóviles, no esporulados y de crecimiento lento, obteniendo su energía de la oxidación de compuestos simples de carbono. Morfológicamente son ligeramente curvos, de 2-10 µm de longitud y 0.2-0.6 µm de ancho (Pickup, 2004).

Una característica patogénica de *M. tuberculosis* es la capacidad para sobrevivir durante mucho tiempo en el hospedero humano, dentro de los macrófagos en los granulomas de los tubérculos (Torres-Gonzalez et al., 2016). Los macrófagos son componentes clave de la respuesta inmune innata del huésped contra *M. tuberculosis* que pueden eliminar las micobacterias a través de diferentes mecanismos, como la inducción de apoptosis, respuestas inmunoinflamatorias y actividad fagocítica (Simmons et al., 2018). Sin embargo, el patógeno puede contrarrestar los mecanismos antimicrobianos del hospedero para asegurar la supervivencia y la persistencia. En la mayoría de las infecciones por *M. tuberculosis*, la respuesta inmune del huésped es capaz de detener el crecimiento bacteriano y eliminar los microorganismos o inducir un estado de infección tuberculosa latente (LTBI). Sin embargo, alrededor del 5-15% de la LTBI progresa a TB activa con afectación pulmonar y / o extrapulmonar (Sckorey et al., 2015). La TB activa generalmente se manifiesta poco después de la infección, pero, en algunos casos, puede ocurrir incluso años después de la infección primaria, debido a una respuesta inmune reducida, lo que indica la importancia de la inmunidad innata y adaptativa en el control de *M. tuberculosis* (Natarajan et al., 2011).

3.3 Fisiopatología

El riesgo de desarrollar TB activa es mayor en pacientes con inmunidad celular disminuida. La infección inicia cuando el bacilo alcanza el alveolo pulmonar, lo invade y posteriormente es fagocitada por los macrófagos alveolares, donde se replica intracelularmente. El macrófago interactúa con los linfocitos T, lo que resulta en la diferenciación de macrófagos en histiocitos epiteloides, los cuales junto con los linfocitos forman granulomas. El bacilo no siempre es eliminado y permanece inactivo, causando una infección latente (Nour-Neamatollahi et al., 2018). El sitio de infección primario es el pulmón, llamado foco de Ghon, en ocasiones crece con la progresión de la enfermedad y se resuelve, dejando una cicatriz visible que puede ser densa y presentar focos de calcificación. Durante el estadio temprano de la infección, los microorganismos se diseminan por la vía linfática a la región hiliar y mediastinal y por vía hematógena a sitios más distantes. El 5% de los individuos infectados por TB tienen inmunocompromiso y la enfermedad activa se desarrolla clínicamente un año después de la infección, lo que se denomina infección progresiva primaria (Chackerian et al., 2002)

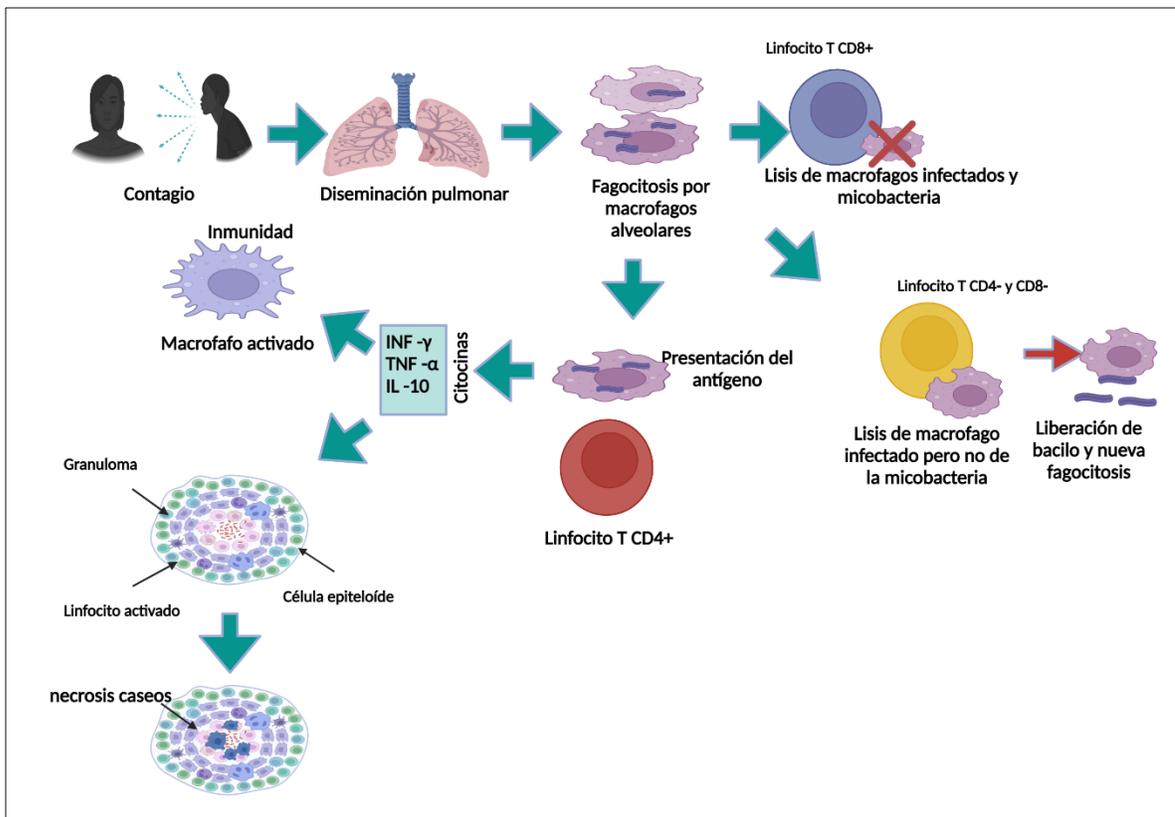


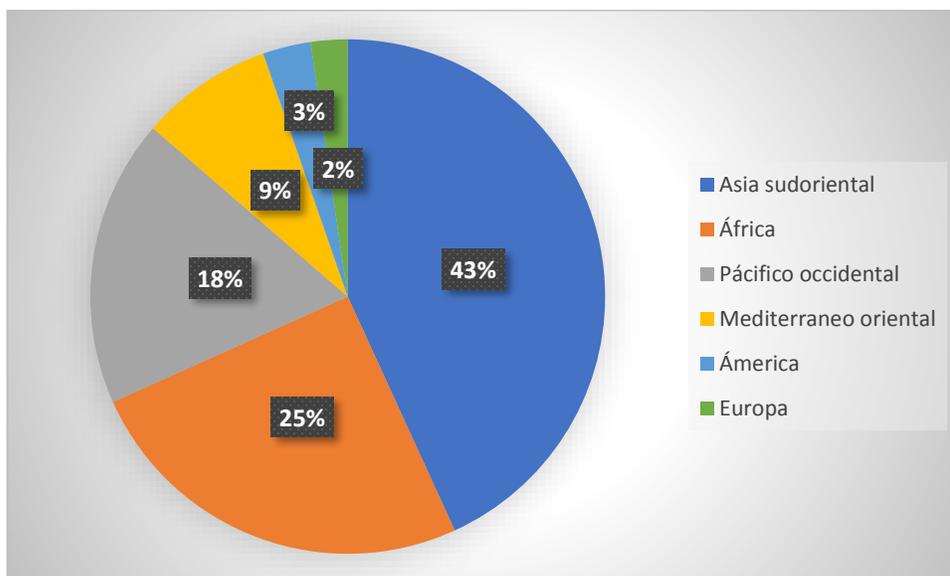
Figura 1. Fisiopatología de la tuberculosis pulmonar. Involucra el contagio (aerosolización), diseminación, fagocitosis de macrófagos, bloqueo y replicación dentro de los fagosomas. La aerosolización es el principio y el final del ciclo de la fisiopatología de la tuberculosis. Una persona que respira los bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* contenidas en microgotas pueden alcanzar los sacos alveolares (que se muestran en primer aumento), ahí son reconocidos por los macrófagos, células dendríticas y monocitos. Los macrófagos fagocitarán la bacteria e intentarán destruir a *M. tuberculosis*, sin embargo, es capaz de prevenir la fusión del fagolisosoma, evita la destrucción, comienza a replicarse. Los macrófagos infectados liberan citocinas, las cuales inician la respuesta innata y reclutan células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC), neutrófilos y macrófagos en diferentes formas. Estas células se combinan para formar el granuloma.

3.4 Epidemiología

La TB continúa siendo una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad. Se estima que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada por tuberculosis, se estima que alrededor del 10% de las personas infectadas de *M. tuberculosis* progresan a la enfermedad de tuberculosos activa durante el lapso de su vida (Ravimohan et al., 2018). La tuberculosis está entre las dos primeras causas de muerte por un agente infeccioso junto con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Glaziou et al., 2013). Según el informe mundial sobre la tuberculosis de la OMS 2019, se notificaron 10 millones de nuevos casos con 1,2 millones de muertes en todo el mundo entre personas VIH negativas y 251,000 muertes entre personas VIH positivas (OMS, 2020). Los objetivos mundiales de tuberculosis no se están cumpliendo en su gran mayoría, aunque hay algunos casos de éxito regionales y nacionales. El principal impacto es una caída mundial en el número de personas recién diagnosticadas y notificadas con TB. Esto se redujo de 7,1 millones en 2019 a 5,8 millones en 2020, una disminución del 18% hasta el nivel de 2012 y muy por debajo de los aproximadamente 10 millones de personas que desarrollaron TB en 2020, por lo que, se estima que 1,4 millones de personas menos recibieron atención para la tuberculosis en 2020 que en 2019. El acceso reducido al diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis ha dado lugar a un aumento de las muertes por tuberculosis. Las mejores estimaciones para 2020 son 1,3 millones de muertes por tuberculosis (OMS, 2020). Entre los impactos más evidentes son las reducciones entre 2019 y 2020 en el número de personas que recibieron tratamiento para TB-MFR (-15%, de 177100 a 150359, aproximadamente 1 de cada 3 personas de los que lo

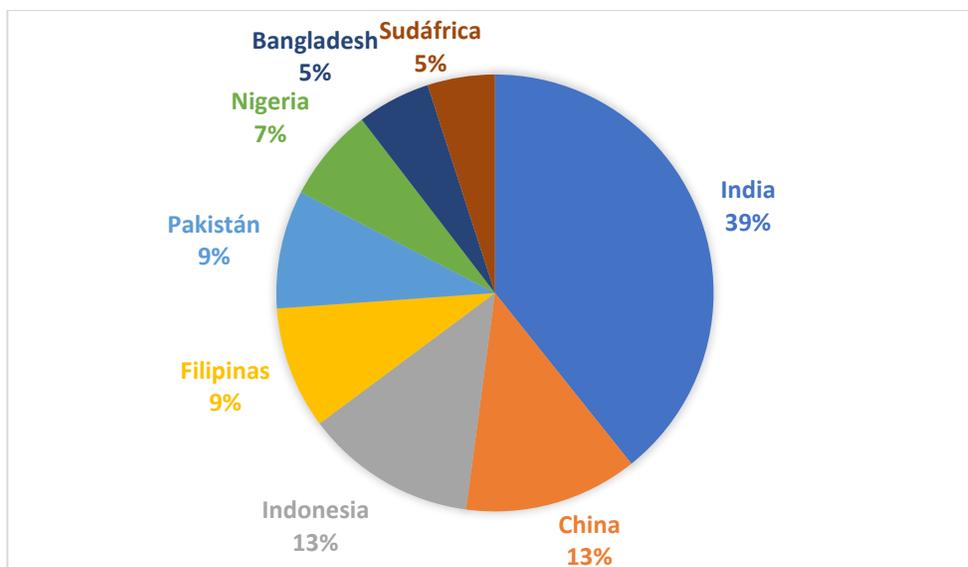
necesitan) y tratamiento preventivo de la TB (-21%, de 3,6 millones a 2,8 millones), y una caída en el gasto mundial en servicios de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis y teme la OMS más de medio millón de personas más puedan haber muerto de tuberculosis en 2020 simplemente porque no pudieron obtener un diagnóstico (OMS, 2021).

De acuerdo con datos de la OMS, geográficamente, en 2020, los porcentajes mundiales de incidencia de casos de tuberculosis son las siguientes:



Gráfica 1. Incidencia de casos de tuberculosis por regiones

Los 30 países con alta carga de TB representaron el 86% de todos los casos incidentes estimados en todo el mundo, y ocho de estos países representaron dos tercios del total mundial:



Gráfica 2. Países con el mayor número de casos de TB (OMS, 2021).

La tuberculosis puede afectar a cualquier persona, independientemente de su edad o sexo. Aunque el grupo más afectado son los hombres adultos, que representan 56% de todos los casos de tuberculosis en 2020; en comparación, mujeres adultas representaron el 33% y los niños el 11% (OMS, 2021).

De acuerdo con los datos del sistema de Salud del país, en las Américas, México ocupa el tercer lugar en el número de casos de tuberculosis pulmonar con un total de 45,929 nuevos eventos de TB reportados al Sistema de Salud Pública en el 2019. La población de México más vulnerable de contraer la tuberculosis son los indígenas, migrantes, personas privadas de su libertad y la población rural en general; es decir, gente con un alto nivel de marginación y exclusión social que vive en condiciones de hacinamiento y pobreza (Cacho Carranza, 2015). De acuerdo con el reporte global de tuberculosis emitido por la OMS en 2017, México tiene una tasa de morbilidad de 22 por cada 100,000 habitantes; la tasa de mortalidad es del 2.3 por cada 100, 000 habitantes (OMS, 2017). Actualmente la resistencia a fármacos antituberculosis agrava seriamente la situación epidemiológica debido a problemas terapéuticos que representa tratar esta enfermedad, dado los diversos determinantes sociales que afectan a las personas con TB. (Saldaña et al., 2004).

3.5 Tuberculosis farmacorresistente

En las últimas décadas, la tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MFR) se ha convertido en uno de los principales retos contra la tuberculosis (Pontali et al., 2018). Se conoce como tuberculosis multifármacorresistente (TB-MFR) a la causada por una cepa que no responde al tratamiento por lo menos con isoniacida y rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces usados en el tratamiento (García et al., 2000). Durante más de 10 años, la mejor estimación de la proporción de personas diagnosticadas con TB por primera vez el tiempo que tuvo MDR / RR-TB se ha mantenido en alrededor del 3-4% y la mejor estimación para aquellos previamente tratados por TB se ha mantenido en alrededor del 18-21% (OMS, 2021). Se le llama resistencia primaria a la que se desarrolla en pacientes que no han recibido anteriormente tratamiento antituberculoso. Mientras que, la resistencia secundaria, es adquirida cuando se desarrolla en pacientes que durante o tras haber recibido fármacos a los que previamente eran sensibles (Bermejo et al., 2007).

En la mayoría de los casos, el tratamiento para la tuberculosis pulmonar es efectivo y puede tener una eficacia hasta del 80%, sin embargo, el origen de la tuberculosis multifármacorresistente generalmente radica en la administración de un tratamiento incorrecto (OMS, 2020) (Sectorial De Salud, 2018). Es decir, el tratamiento inapropiado con estos medicamentos, ya sea administrar dosis inadecuadas, automedicación de los pacientes o el empleo de medicamentos de mala calidad, puede llevar a la generación de cepas de *M. tuberculosis* con resistencia a los dos fármacos más efectivos que son la isoniazida y la rifampicina; estos casos son de difícil re-tratamiento y puede requerir hasta 25 meses de tratamiento y solo alcanza una eficacia del 60% (OMS, 2020); aunado a eso, el tratamiento para la TB-MFR puede llegar a ser tóxico en algunos casos y de alto costo (Pontali et al., 2018).

La tuberculosis representa un problema grave de Salud Pública en nuestro país, pues el tratamiento es de costos más elevados y menos exitoso que en el caso de la tuberculosis sensible y puede dar origen a cepas de *M. tuberculosis* con resistencia extendida (XDR-TB). Ésta se define como la resistencia a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina), además de la resistencia a múltiples medicamentos (García et al., 2000).

La detección de la resistencia a los medicamentos requiere la confirmación bacteriológica de la tuberculosis y las pruebas de resistencia a los medicamentos mediante pruebas moleculares rápidas, métodos de cultivo o tecnologías de secuenciación. El tratamiento requiere un curso de medicamentos de segunda línea durante al menos 9 meses y hasta 20 meses, apoyado por asesoramiento y seguimiento para eventos adversos. La OMS recomienda un acceso ampliado a los regímenes totalmente orales. A nivel mundial, en 2020, el 71% (2,1 / 3,0 millones) de las personas diagnosticadas con enfermedad pulmonar será confirmada bacteriológicamente. (OMS, 2020). Se hicieron pruebas de tuberculosis para determinar la resistencia a la rifampicina, en comparación con el 61%. (2,2 / 3,6 millones) en 2019 y 50% (1,7 / 3,4 millones) en 2018. Entre estos, 132,222 casos de MDR / RR-TB y 25,681 se detectaron casos de TB pre-XDR o TB-XDR, para un total combinado de 157,903. Esta fue una gran caída (del 22%) del total de 20,1997 personas detectadas con TB resistente a los medicamentos en 2019, lo que coincide con reducciones igualmente grandes en el número total de personas recién diagnosticadas con TB (18%) y el número total de personas diagnosticadas con TB pulmonar confirmada bacteriológicamente (17%) observados entre 2019 y 2020. En todo el mundo, 150 359 personas con MDR / TB-RR se inscribieron en tratamiento en 2020, un 15% menos que el total de 177,100 en 2019. Lo que equivale a una en tres de las personas que desarrollan MFR / TB-RR cada año (OMS, 2021).

En México hay de 2.4 a 3.3 % de casos con farmacorresistencia y/o la multifarmacorresistencia en casos nuevos de pacientes con TB (García et al., 2000). Se han observado en México alrededor de 20 mil casos por año y más de 2 mil muertes, lo que significan 55 enfermos nuevos y 6 defunciones diarias con un 67% de incidencia en hombres y 33% para mujeres. La principal comorbilidad es diabetes mellitus tipo 2, con un 49% de los casos totales, seguido de desnutrición y alcoholismo con un 15% y 8%, respectivamente (Torres-Gonzalez et al., 2016).

Además de los descritos anteriormente, existen otros tipos de resistencia a la tuberculosis como: monorresistencia: resistencia a un solo fármaco antituberculoso de primera línea. Polirresistencia a fármacos: resistencia a más de un fármaco antituberculoso de primera línea, además de la isoniazida y la rifampicina. Resistencia a múltiples fármacos (MFR): resistencia al menos tanto a la isoniazida como a la rifampicina. Resistencia a la rifampicina (RR): resistencia a la rifampicina detectada mediante métodos fenotípicos o genotípicos, con o sin resistencia a otros fármacos antituberculosos. Incluye cualquier resistencia a la rifampicina, ya sea monoresistencia, multirresistencia, polirresistencia o resistencia extensa a fármacos (OMS, 2021).

La TB-MFR se debe principalmente al uso indebido o incorrecto de los medicamentos antimicrobianos, la administración de fórmulas de medicamentos ineficaces (uso de un solo fármaco, medicamentos de baja calidad o mal almacenados) y la interrupción temprana del tratamiento pueden causar resistencia a medicamentos que puede desarrollarse y luego ser transmitida, especialmente en lugares con una gran cantidad de personas, como prisiones u hospitales.(OMS, 2021)

3.5.1 Diagnóstico

El diagnóstico de TB-MFR requiere el diagnóstico de tuberculosis y evidencia de resistencia al menos a la isoniazida y rifampicina (OMS, 2017). Actualmente, los

métodos utilizados para el diagnóstico, el seguimiento y el desenlace de la terapia son bacteriológicos e incluyen: 1) Las baciloscopías, tinción del bacilo en muestras de esputo, la cual no es lo suficientemente sensible para detectar poblaciones escasas de bacilos y puede detectar poblaciones de bacilos no viables dando una idea falsa de falla farmacológica. 2) La prueba de GeneXpert MTB/RIF, amplificación del material genético de *M. tuberculosis* con la detección del gen de resistencia a rifampicina; no obstante, puede haber bacterias no viables que interfieran con el resultado dando falsos positivos (Pontali et al., 2018) y 3) El cultivo de *M. tuberculosis* en medios sólidos, la cual es considerada como la “prueba de oro”, que tiene como principal limitación el tiempo de crecimiento de *M. tuberculosis*, el cual es de un mes (Sectorial De Salud, 2018). Aunado a las limitantes específicas de cada técnica, todas dependen de la muestra de esputo y, una vez que el tratamiento reduce el número de bacterias y el paciente deja de expectorar, no es posible tener un método de seguimiento o monitoreo de la eficacia a tratamiento (CENAPRECE, 2014).

3.5.2 Tratamiento

Como ya se mencionó, el tratamiento contra la tuberculosis multifarmacorresistente es difícil ya que se ha observado que los medicamentos de segunda línea son débiles y pueden llegar a ser tóxicos. Estos medicamentos de segunda línea se desarrollaron hace décadas, pero su uso es limitado debido a sus perfiles deficientes por los efectos secundarios que presentan (Seung et al., 2015). El tratamiento con medicamentos de segunda línea para TB-MFR normalmente toma un periodo entre 18 a 24 meses. Se ha reportado que, en los mejores programas de tratamiento se tiene una efectividad del 60% al 80% (Muñoz-Torrico et al., 2017). Sin embargo, en general, el tratamiento de la TB-MFR tiene una tasa de curación menor. A nivel mundial, la tasa de eficacia del tratamiento es del 48% (OMS, 2017).

Los fármacos antituberculosos se han dividido tradicionalmente en fármacos antituberculosos de primera y segunda línea, siendo isoniazida, rifampicina,

pirazinamida, etambutol y estreptomycin los principales fármacos antituberculosos de primera línea. En la siguiente tabla se mencionarán los principales fármacos antituberculosos de primera línea y sus efectos secundarios

Tabla 1. Principales fármacos de primera y segunda línea			
Nombre del fármaco (abreviatura)	Descripción y dosis para adultos	Efectos secundarios	Seguimiento y comentarios adicionales
Fármacos de primera línea			
Isoniazida (H)	Bactericida; inhibe la síntesis de ácido micólico más eficazmente en células en división; metabolizado hepáticamente. Dosis: 300 mg al día o 900 mg dos o tres veces por semana	Frecuentes: Hepatitis (10-20% tiene transaminasas elevadas), neuropatía periférica (relacionada con la dosis; mayor riesgo de desnutrición, alcoholismo, diabetes, uso concomitante de aminoglucósidos o etionamida). Menos frecuentes: Ginecomastia, erupción cutánea, psicosis, convulsiones.	Monitoreo: considerar las enzimas hepáticas iniciales y mensuales, especialmente si la edad es > 50 años. Comentarios: Administrar con piridoxina 50 mg / d si usa una dosis grande o si el paciente tiene riesgo de neuropatía periférica (diabetes, alcoholismo, VIH, etc.).
Rifamicina (R) Rifabutina (Rfb) Rifapentina (Rpt)	Descripción: Bactericida; inhibe la síntesis de proteínas bloqueando la transcripción y síntesis de ARNm; metabolizado hepáticamente. Dosis: rifampicina 600 mg / d; rifabutina 300 mg / d.	Frecuentes: secreciones corporales de color naranja, transaminitis transitoria, hepatitis, malestar gastrointestinal. Menos frecuentes: ictericia colestásica.	Monitoreo: considerar las enzimas hepáticas de referencia, repetir si aparecen síntomas (ictericia, fatiga, anorexia, debilidad o náuseas y vómitos).
Pirazinamida (Z)	Descripción: Bactericida; mecanismo poco claro; eficaz en medio ácido (p. ej., enfermedad cavitaria, organismos intracelulares); metabolizado como hepáticamente, excretado renalmente. Dosis: 15 a 40 mg / kg al día.	Frecuentes: artritis / artralgias, hepatotoxicidad, hiperuricemia, malestar abdominal. Menos frecuentes: deterioro del control de la diabetes, sarpullido.	Monitorización: Enzimas hepáticas basales, El ácido úrico se puede medir si hay artralgias, artritis o síntomas de gota. Comentarios: generalmente se administra una vez al día, pero puede dividir la dosis inicialmente para mejorar la tolerancia.
Etambutol (E)	Descripción: Bacteriostático a dosis convencional (15 mg / kg); inhibe el metabolismo de los lípidos y la pared celular; excretado	Frecuentes: generalmente bien tolerado. Menos frecuentes: neuritis óptica, malestar gastrointestinal, artritis / artralgia.	Monitoreo: prueba de agudeza visual mensual y de referencia y prueba de visión de color rojo / verde cuando se

	renalmente. Dosis: 15-25 mg / kg.		administra en dosis superiores a 15 mg / kg al día (una pérdida > 10% se considera significativa); Preguntar regularmente al paciente sobre los síntomas visuales.
Estreptomina (S)	Descripción: Bactericida; los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas mediante la alteración de la función ribosómica; menos eficaz en entornos intracelulares ácidos; los polipéptidos parecen inhibir la translocación del peptidil-tRNA y el inicio de la síntesis de proteínas; excretado renalmente. Dosis: 15-20 mg / kg al día.	Frecuentes: dolor en el lugar de la inyección; proteinuria; pérdida de electrolitos (más común con capreomicina); ototoxicidad coclear (pérdida de audición, dosis relacionada con concentraciones acumuladas y máximas, mayor riesgo de insuficiencia renal, puede ser irreversible). Menos frecuentes: nefrotoxicidad (relacionada con la dosis con concentraciones acumuladas y máximas, mayor riesgo de insuficiencia renal, a menudo irreversible); neuropatía periférica; erupción; toxicidad vestibular (náuseas, vómitos, vértigo, ataxia, nistagmo); eosinofilia; ototoxicidad potenciada por ciertos diuréticos, especialmente diuréticos de asa.	Monitorización: creatinina, urea y potasio sérico basales y luego mensuales; con mayor frecuencia en pacientes de alto riesgo; si el potasio es bajo, control de magnesio y el calcio; audiometría basal y seguimiento mensual en pacientes de alto riesgo (pacientes de alto riesgo: ancianos, diabéticos, pacientes VIH positivos o pacientes con insuficiencia renal). Comentarios: Aumento en el intervalo de dosificación o reducir la dosis y controlar las concentraciones séricas del fármaco según sea necesario para controlar los efectos secundarios.

Fármacos de segunda línea

Ofloxacino (Ofx)	Descripción: Bactericida; inhibición de la enzima ADN-girasa presente en aquellos gérmenes que son causales de procesos infecciosos Dosis: 800-1000 mg/d	Frecuentes: tendinitis náuseas, diarrea, estreñimiento, gases, vómitos, dolor de estómago o calambres, cambio en la capacidad para saborear los alimentos, pérdida de apetito, boca seca, cansancio excesivo, piel pálida, dolor, inflamación o picazón de la vagina. Menos frecuentes: neuritis óptica, malestar gastrointestinal, artritis / artralgia, dificultad para respirar.	Monitorización Si el paciente es alérgico o ha tenido una reacción grave a la ofloxacina, a cualquier otro antibiótico de quinolona o fluoroquinolona como ciprofloxacina (Cipro), gemifloxacina (Factive), levofloxacina (Levaquin), y moxifloxacina (Avelox), a cualquier otro medicamento, o a cualquier de los ingredientes de las tabletas de ofloxacina.
Levo-	Descripción: Bactericida; In	Frecuentes: generalmente bien	Monitoreo: Sin

<p>floxacina (Lfx)</p>	<p>inhibidor de ADN girasa; excretado renalmente.</p> <p>Dosis: levofloxacina 750 a 1000 mg / d</p>	<p>tolerado, bien absorbido.</p> <p>Menos frecuentes: diarrea, mareos, malestar gastrointestinal, dolor de cabeza, insomnio, fotosensibilidad, erupción cutánea, vaginitis, tendinitis, psicosis, convulsiones (efectos sobre el sistema nervioso central que se observan casi exclusivamente en ancianos).</p>	<p>requisitos de monitoreo de laboratorio.</p> <p>Comentarios: No administrar con antiácidos, sucralfato, hierro, zinc, calcio o reemplazos orales de potasio y magnesio; levofloxacina, moxifloxacina tienen la mayor actividad contra <i>M. tuberculosis</i>.</p>
<p>Moxifloxacina (Mfx)</p>	<p>Descripción: Bactericida; Inhibidor de ADN girasa; excretado renalmente.</p> <p>Dosis: levofloxacina 750 a 1000 mg / d; moxifloxacina 400 mg / d.</p>	<p>Frecuentes: generalmente bien tolerado, bien absorbido.</p> <p>Menos frecuentes: diarrea, mareos, malestar gastrointestinal, dolor de cabeza, insomnio, fotosensibilidad, erupción cutánea, vaginitis, tendinitis, psicosis, convulsiones (efectos sobre el sistema nervioso central que se observan casi exclusivamente en ancianos).</p>	<p>Monitoreo: Sin requisitos de monitoreo de laboratorio.</p> <p>Comentarios: No administrar con antiácidos, sucralfato, hierro, zinc, calcio o reemplazos orales de potasio y magnesio; levofloxacina, moxifloxacina tienen la mayor actividad contra <i>M. tuberculosis</i>.</p>
<p>Amoxicilina (Amx)</p>	<p>Descripción: Inhibidor de penicilina / β-lactámicos; evidencia clínica muy limitada de eficacia.</p> <p>Dosis: 80 mg / kg al día divididos en dos tomas.</p>	<p>Frecuentes: la diarrea y las molestias abdominales son las más frecuentes; náuseas y vómitos.</p> <p>Menos frecuentes: hipersensibilidad y erupción; Se han informado efectos secundarios raros en otros sistemas de órganos.</p>	<p>Monitorización: solo monitorización sintomática.</p> <p>Comentarios: Se tolera mejor y se absorbe bien cuando se toma al comienzo de una comida estándar.</p>
<p>Kanamicina (Km)</p>	<p>Descripción: Bactericida; los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas mediante la alteración de la función ribosómica; menos eficaz en entornos intracelulares ácidos; los polipéptidos parecen inhibir la translocación del peptidil-tRNA y el inicio de la síntesis de proteínas; excretado renalmente.</p> <p>Dosis: 15-20 mg / kg al día.</p>	<p>Frecuentes: dolor en el lugar de la inyección; proteinuria; pérdida de electrolitos (más común con capreomicina); ototoxicidad coclear (pérdida de audición, dosis relacionada con concentraciones acumuladas y máximas, mayor riesgo de insuficiencia renal, puede ser irreversible).</p> <p>Menos frecuente: nefrotoxicidad (relacionada con la dosis con concentraciones acumuladas y máximas, mayor riesgo de insuficiencia renal, a menudo irreversible); neuropatía periférica; erupción; toxicidad vestibular (náuseas, vómitos, vértigo, ataxia, nistagmo); eosinofilia; ototoxicidad potenciada por ciertos diuréticos, especialmente diuréticos de asa.</p>	<p>Monitorización: creatinina, urea y potasio sérico basales y luego mensuales; con mayor frecuencia en pacientes de alto riesgo; si el potasio es bajo, controle el magnesio y el calcio; audiometría basal y seguimiento mensual en pacientes de alto riesgo (pacientes de alto riesgo: ancianos, diabéticos, pacientes VIH positivos o pacientes con insuficiencia renal).</p> <p>Comentarios: Aumentar el intervalo de dosificación o reducir la dosis y controle las concentraciones</p>

			séricas del fármaco según sea necesario para controlar los efectos secundarios.
Etionamida (Eto) Protionamida (Pto)	Descripción: Puede ser bactericida o bacteriostático según la susceptibilidad y las concentraciones alcanzadas en el sitio de la infección; el grupo carbotioamida, que también se encuentra en la tiacetazona, y el anillo de piridina, que también se encuentra en la isoniazida, parecen esenciales para la actividad; metabolizado hepáticamente, excretado renalmente. Dosis: 500 a 1000 mg / d.	Frecuentes: malestar gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, pérdida del apetito); disgeusia (sabor metálico); hipotiroidismo (especialmente cuando se toma con PAS). Menos frecuentes: artralgias, dermatitis, ginecomastia, hepatitis, impotencia, neuropatía periférica, fotosensibilidad.	Monitoreo: considerar para las enzimas hepáticas basales. Comentarios: Se puede dividir la dosis o administrarse antes de acostarse para mejorar la tolerabilidad; las eficacias de etionamida y protionamida se consideran similares; la protionamida puede causar menos efectos adversos gastrointestinales.
Cicloserina (Cs)	Descripción: Bacteriostático; análogo de alanina; interfiere con la síntesis de proteoglicanos de la pared celular; excretado renalmente. Dosis: 500 a 1000 mg / d.	Frecuentes: alteraciones neurológicas y psiquiátricas, incluidos dolores de cabeza, irritabilidad, alteraciones del sueño, agresión y temblores. Menos frecuentes: psicosis, neuropatía periférica, convulsiones (mayor riesgo de efectos sobre el sistema nervioso central con el uso simultáneo de etanol, isoniazida, etionamida u otros medicamentos de acción central), hipersensibilidad	Monitorización: Considerar la monitorización del fármaco en suero para establecer la dosificación óptima. Comentarios: Administrar 50 mg de piridoxina por cada 250 mg de cicloserina (para disminuir los efectos adversos neurológicos).
Ácido paraaminosalicílico (PAS)	Descripción: Bacteriostático; interrumpe el metabolismo del ácido fólico (se cree que inhibe la biosíntesis de la coenzima F en la vía del ácido fólico); acetilación hepática, excretada por vía renal. Dosis: Depende de la formulación específica	Frecuentes: malestar gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea); hipersensibilidad; hipotiroidismo (especialmente cuando se toma con etionamida). Menos frecuente: hepatitis, anomalías electrolíticas. Interacciones farmacológicas: disminución de la acetilación de isoniazida; disminución de la absorción de rifampicina en preparaciones no granuladas; disminución de la absorción de vitamina B 12.	Monitoreo: Sin requisitos de monitoreo de laboratorio. Comentarios: PASER consiste en gránulos con recubrimiento entérico que deben administrarse con un alimento o bebida ácida (p. Ej., Yogur o jugo ácido); PASER es estable hasta 8 semanas a 40 ° C y 75% de humedad, por lo que puede distribuirse al paciente mensualmente en la mayoría de los entornos sin cadena de frío; si se necesita un almacenamiento de > 8 semanas, se requiere refrigeración por debajo de 15 ° C.

- | | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
- (Seung et al., 2009), (Seung et al., 2015), ((Ángel Córdova Villalobos et al., 2009)

En el diseño del tratamiento en pacientes con TB-MFR hay que tomar en cuenta el historial detallado del tratamiento anterior de la TB, en especial en pacientes que han recibido múltiples ciclos de tratamiento con fármacos antituberculosos, ya sea de primera o de segunda línea. Una regla general es considerar que todos los fármacos que se utilizaron en el anterior tratamiento para la TB son poco eficaces y, por ende, no es recomendable utilizarlos para el nuevo tratamiento, incluso si una prueba de sensibilidad a los medicamentos (DST) dice lo contrario (Seung et al., 2015).

Para el diseño del tratamiento de TB-MFR se deben incluir al menos cuatro medicamentos antituberculosos de segunda línea que probablemente sean eficaces. Todos los regímenes deben incluir una fluoroquinolona de última generación, como levofloxacin o moxifloxacin (Gillespie et al., 2005), un fármaco inyectable de segunda línea y otros fármacos orales de segunda línea (Peloquin et al., 2008). También se puede incluir pirazinamida, a menos que exista una contraindicación o evidencia de que no es probable que sea eficaz contra la cepa del paciente. La pirazinamida a menudo se incluye de forma rutinaria en los regímenes de MFR en entornos con recursos limitados porque con frecuencia no se dispone de DST a pirazinamida. (Nourzad et al., 2017)

La dosificación de los medicamentos antituberculosos dependerá del peso del paciente. Aunque la mayoría de los fármacos antituberculosos son administrados una vez al día para incrementar su potencial antibacteriano, muchos de los fármacos de segunda línea se administran dos veces al día, esto es debido a que estos fármacos tienen efectos secundarios graves (P et al., 2013)

El tratamiento de la TB-MFR debe continuar durante un mínimo de 20 meses y al menos 18 meses después de que el paciente se vuelva negativo en el cultivo, lo

que sea más largo. Los pacientes crónicos con enfermedad pulmonar extensa pueden requerir tratamiento de TB-MFR durante 24 meses o más (Ravimohan et al., 2018) (PA et al., 1989).

Los cultivos de esputo deben realizarse mensualmente durante el tratamiento. Otros síntomas y signos son importantes, pero no se puede confiar en ellos para determinar el fracaso del tratamiento o la curación. Los programas con una capacidad de cultivo muy limitada pueden considerar hacer frotis mensuales y cultivos cada dos meses después de suspender el inyectable, pero esto puede retrasar la identificación del fracaso del tratamiento (Seung et al., 2015)

3.6 TB-MFR, diagnóstico, comorbilidad.

El control de la tuberculosis sigue siendo uno de los desafíos primordiales en salud mundial, especialmente en países en desarrollo (Arcos et al., 2009). Del mismo modo, las diferentes formas de tuberculosis (TB) resistentes a los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea presentan un gran desafío para los pacientes, los trabajadores de la salud y los servicios de atención médica. Muchos casos nuevos de TB-MDR se crean cada año por una combinación de errores médicos y el cumplimiento deficiente del tratamiento por parte del paciente, lo que convierte a organismos totalmente susceptibles, o aquellos con patrones de resistencia menos complejos, en pacientes con TB-MFR (Wood & Iseman, 2010). La carga de la TB-MFR varía significativamente de un país a otro y de una región a otra (Dye et al., 2002). Al igual que ocurre con la tuberculosis en sí, la carga de la tuberculosis multirresistente (TB-MFR) se encuentra en los países subdesarrollados, donde hay una gran carga de recursos, pero escasez de estos. Por la parte del diagnóstico, este depende de la confirmación del patrón de susceptibilidad a los fármacos de los organismos aislados, donde solo es posible en la mayoría de las ocasiones en los países desarrollados, lo cual para que se lleve a cabo debe haber una fuerte sospecha de resistencia a los medicamentos, incluida la TB-MFR, en personas con

antecedentes de tratamiento previo o en casos donde hubo fracaso del tratamiento. El tratamiento en los países desarrollados es costoso e implica un régimen individualizado basado en datos de susceptibilidad a los medicamentos y el uso de medicamentos de reserva. En entornos de escasos recursos, se puede utilizar un régimen de retratamiento de la OMS, pero cada vez más se pasa a un régimen “DOTS” basado en el tratamiento de observación directa en un programa nacional de tuberculosis respaldado. Sin embargo, incluso cuando se administra dicho tratamiento, el resultado para los pacientes es significativamente peor que el de la tuberculosis totalmente susceptible y tiene un costo mucho más alto. Por otra parte, el diagnóstico de la TB-MFR se basa en pruebas microbiológicas en las que las muestras de esputo se untan directamente en los portaobjetos y se tiñen con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN); a pesar de una alta especificidad, se ha informado que la sensibilidad de la prueba varía de 20 a 80%. El cultivo de *M. tuberculosis* es el estándar de oro para el diagnóstico y cura de la TB, ya que es más sensible que la microscopía; sin embargo, se necesitan alrededor de 10 bacterias/ml, con una sensibilidad del 80-85% y una especificidad del 98% aproximadamente, lo cual crea un alto número de pacientes con cepas con TB-MFR sin diagnosticar. El principal problema de los métodos de diagnóstico, en especial en el cultivo de *M. tuberculosis* es que los pacientes dejan de expectorar a los pocos meses de haber iniciado el tratamiento. Por otro lado, a nivel mundial, solo el 57% de los pacientes con TB-RR/MFR y el 47% de los que tenían TB-RR/MFR y resistencia a las fluoroquinolonas tuvieron un resultado de tratamiento exitoso según la cohorte que comenzó el tratamiento en 2017. En los últimos cinco años, las cifras de pacientes con éxito al tratamiento aumentaron ligeramente, sin embargo, las cifras siguen siendo demasiado bajas. (Ravimohan et al., 2018)

Investigaciones anteriores informaron que los exosomas contienen múltiples moléculas biológicas (como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y miARNs) y están involucrados en muchos procesos fisiológicos y patológicos. En el caso de la tuberculosis, se ha informado que *M. tuberculosis* puede utilizar a los exosomas como mecanismo de liberación de biomoléculas de la célula huésped. Por lo tanto,

en este trabajo, proponemos miARNs de exosomas séricos de pacientes con TB-MFR como biomarcadores no invasivos.(Lyu et al., 2019a)

3.7 Comorbilidades

3.7.1 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula la concentración de glucosa en la sangre, es decir, la glucemia. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia, que, con el tiempo, daña gravemente muchos órganos y sistemas, sobre todo los nervios y los vasos sanguíneos (OMS, 2021).

La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) representa del 5% al 10% de la DM y se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células beta productoras de insulina en los islotes del páncreas. Como resultado, hay una deficiencia absoluta de insulina. Una combinación de susceptibilidad genética y factores ambientales como infecciones virales, toxinas o algunos factores dietéticos se han implicado como desencadenantes de la autoinmunidad. La DM1 se observa con mayor frecuencia en niños y adolescentes, aunque puede desarrollarse a cualquier edad (OMS, 2021a).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (denominada anteriormente diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) se debe que el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La mayoría de los pacientes con diabetes tienen el tipo 2, que, en gran medida, se debe al exceso de peso y a la falta de actividad física (OMS, 2020)

La DM2 se reconoce como un problema grave de salud pública con un impacto considerable en la vida humana y los gastos en salud. El rápido desarrollo

económico y la urbanización han provocado un aumento de la carga de diabetes en muchas partes del mundo (EM & BM, 2018). La diabetes afecta las capacidades funcionales y la calidad de vida de las personas, lo que provoca una morbilidad significativa y una mortalidad prematura (Ramtahal et al., 2015).

A nivel mundial, se estima que 462 millones de personas se ven afectadas por la diabetes tipo 2, lo que corresponde al 6,28% de la población mundial. Más de 1 millón de muertes se atribuyeron a esta condición solo en 2017, ubicándola como la novena causa principal de mortalidad. Se estima que uno de cada 11 adultos padece diabetes en el mundo y 1 de cada 2 adultos con diabetes está sin diagnosticar. Este es un aumento alarmante en comparación con 1990, cuando la diabetes tipo 2 se clasificó como la decimoctava causa principal de muerte. En términos de sufrimiento humano (AVAD), la diabetes se ubica como la séptima enfermedad principal (Khan et al., 2020).

México se encuentra en el sexto lugar a nivel mundial, con una cifra de alrededor de 11.5 millones de adultos diagnosticados con diabetes a los que se anexan los casi 2 mil casos no diagnosticados (FID, 2015). En 2012 se catalogó a la diabetes como el segundo padecimiento más frecuente como causa de muerte en la población mexicana, esto con una cifra donde las mujeres representan un 16.6% equivalente a 43,819 casos y los hombres un 12.2%, ambos casos equivalentes a 41,236 defunciones (INEGI, 2018). Sin embargo, el 9.4% de los adultos entrevistados en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Medio Camino contestaron haber recibido el diagnóstico de diabetes por parte de un médico (INSP, 2017).

3.7.1.1 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y tuberculosis

La susceptibilidad de DM2 para el desarrollo de TB ha sido aceptada desde hace tiempo. En los últimos años, estas dos enfermedades han estado creciendo de una manera preocupante, en especial en los países subdesarrollados, donde la

falta de saneamiento, una mala nutrición y el hacinamiento son un problema (Dooley & Chaisson, 2009).

La tuberculosis y la diabetes mellitus sigue siendo un problema de salud pública global en todo el mundo. Alrededor del 95% de los pacientes con tuberculosis viven en países de bajos y medianos ingresos y más del 70% de los pacientes con diabetes también viven en los mismos países. La incidencia de diabetes mellitus está aumentando en todo el mundo, y emergiendo como un problema de salud importante en los países en desarrollo, donde la prevalencia de tuberculosis es alta. Se realizó un estudio en India, con el objetivo de determinar la prevalencia de la diabetes entre los casos diagnosticados de tuberculosis de 2013 a 2014, de 662 pacientes con tuberculosis, se encontró una prevalencia de diabetes de 12.39%, 53 % de hombres y 69.7% de tuberculosis pulmonar. El sexo masculino, la edad > 50 años y el IMC > 25 se asociaron más frecuentemente con diabetes. (Nagar et al., 2018). En otro estudio en el mismo año se estimó que el 15% de los casos de tuberculosis en adultos en todo el mundo se atribuyeron a la diabetes, lo que corresponde a 1 millón de casos de tuberculosis asociada a la diabetes por año (Baker et al., 2011).

La convergencia de ambas enfermedades en México ha llevado a la Federación Internacional de Diabetes (FID) a concluir que más del 10% de los pacientes con tuberculosis se tienen DM2. Se analizó el Registro Nacional de Tuberculosis de 2000 a 2012 en mayores de 20 años con el objetivo de describir la incidencia de tuberculosis pulmonar asociadas con diabetes. En total 181,378 individuos. 19,29% (34.988) habían sido diagnosticados previamente con DM2 por un médico. Se observaron las tasas más altas para las edades de 60 y más y de 40 a 59 años. Por análisis multivariados, los pacientes mayores, residentes de la Ciudad de México tuvieron mayor asociación de tuberculosis y diabetes. Según la Secretaría de Salud de México, en 2013 la prevalencia de DM2 fue de 414 por 100.000 habitantes, y la incidencia de TB pulmonar fue de 13,52 por 100.000 habitantes, mientras que la prevalencia de comorbilidad TB-DM2 fue de 21%. En

el caso de la TB-MFR la DM2 es la principal comorbilidad con un 49% de los casos (CENAPRECE, 2014).

Se ha identificado a la DM2 como un factor de riesgo para el desarrollo de TB activa. con tasas que oscilan entre el 10% y el 30%. Además, la diabetes mellitus también parece estar asociada con una mayor gravedad de la enfermedad de tuberculosis entre la población infectada y tener un efecto nocivo tanto en la presentación de la enfermedad como en la respuesta al tratamiento (Nathella & Babu, 2017). Un metaanálisis de 13 estudios observacionales sobre el riesgo de enfermedad de tuberculosis en pacientes con DM2 determinó que los pacientes diabéticos tenían 3 a 1 veces más probabilidades de tener tuberculosis que los individuos no diabéticos. Posteriormente, más de 40 estudios diferentes, incluidos cuatro estudios prospectivos, 16 estudios retrospectivos y 17 estudios de casos y controles, han confirmado la mayor susceptibilidad de las personas con DM2 a la enfermedad de tuberculosis (Jeon & Murray, 2008).

Se ha observado que la inmunidad disminuida que se presenta en pacientes con diabetes contribuye a la evolución de la infección de tuberculosis latente a tuberculosis activa. Además, las personas con TB que tienen DM2 tienen una respuesta más pobre al tratamiento que las que no tienen DM2 y, por lo tanto, tienen un mayor riesgo de fracaso del tratamiento de la TB, muerte y recaída después de la cura (Baker et al., 2011). El fracaso del tratamiento, a su vez, añade otro desafío importante al programa mundial de control de la tuberculosis, una tuberculosis resistente a los medicamentos (Tegegne et al., 2018).

La DM2 es un factor de riesgo para el desarrollo de cualquier tipo de tuberculosis incluida la TB-MFR. Estudios previos han encontrado un aumento de 2,1 a 8,8 veces en el riesgo de TB-MFR entre los pacientes con TB comórbidos con diabetes (Baghaei et al., 2013), (Prachi P. Singh et al., 2011) (NA et al., 2014). Además, los estudios observacionales de Israel, Georgia y México mostraron que los pacientes con TB con DM tenían un mayor riesgo de desarrollar TB-MFR. Sin

embargo, no se sabe en qué medida la DM2 predispone a la TB-MFR. (Muñoz-Torrice et al., 2017).

Aunque no se ha identificado una causa definida de hiperglucemia asociada con la tuberculosis, se han sugerido algunos mecanismos probables (F et al., 2009). Por ejemplo, se ha sugerido que la inflamación causada por citocinas como IL6 y TNF α en respuesta a la infección por tuberculosis puede provocar un aumento de la resistencia a la insulina y una disminución de la producción de insulina, lo que da lugar a hiperglucemia (Razanamparany et al., 2002).

3.8 Biomarcadores para la tuberculosis pulmonar

Los biomarcadores, se definen como moléculas que son objetivamente medibles y son indicadores de procesos biológicos normales, procesos patológicos o de una respuesta observada ante una intervención terapéutica. Un biomarcador es un indicador medible de la gravedad o presencia de algún estado de enfermedad (Goletti et al., 2016), (Subra et al., 2010). Los biomarcadores pueden ser células, moléculas o genes, productos genéticos, enzimas u hormonas específicos. Las funciones de órganos complejos o los cambios característicos generales en las estructuras biológicas también pueden servir como biomarcadores.

Un biomarcador puede indicar un cambio en la expresión o el estado de una proteína que se correlaciona con el riesgo o la progresión de una enfermedad, o con la susceptibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado. Los biomarcadores pueden ser propiedades biológicas características o moléculas que se pueden detectar y medir en partes del cuerpo. Pueden indicar procesos normales o patológicos en el cuerpo. Aunque el término biomarcador es relativamente nuevo, los biomarcadores se han utilizado en la investigación preclínica y el diagnóstico clínico durante un tiempo considerable (FDA, 2011).

Los biomarcadores pueden ser evaluados en diferentes células y fluidos. Sin embargo, en el caso de tuberculosis la sangre periférica es la más estudiada debido a su accesibilidad (Wallis et al., 2010).

Cuando se utilizan como resultados en ensayos clínicos, los biomarcadores se consideran criterios de valoración sustitutos; es decir, actúan como sustitutos o sustitutos de criterios de valoración clínicamente significativos. Pero no todos los biomarcadores son criterios de valoración sustitutos, ni tampoco se pretende que lo sean. Los criterios de valoración sustitutos son un pequeño subconjunto de biomarcadores bien caracterizados con relevancia clínica bien evaluada. Para ser considerado un criterio de valoración sustituto, debe haber evidencia científica de que un biomarcador predice de manera consistente y precisa un resultado clínico, ya sea un beneficio o un daño. En este sentido, un criterio de valoración sustituto es un biomarcador en el que se puede confiar para que sirva como una alternativa, pero no como sustituto, de un criterio de valoración clínico (Strimbu & Tavel, 2010).

3.8.1 Exosomas como biomarcadores

Los exosomas son nanovesículas de 50 a 100 nm de diámetro que se liberan de la mayoría de las células viables. El conocimiento actual sugiere que los exosomas corresponden a las vesículas intraluminales de cuerpos multivesiculares endosomales (MVB), liberados en el ambiente extracelular después de la fusión MVB con la membrana plasmática (C et al., 2002). Se forman por invaginación de la membrana de los endosomas tardíos, lo que da como resultado vesículas que contienen componentes citosólicos y exponen el dominio extracelular de algunos receptores de la membrana plasmática en su superficie (Huotari & Helenius, 2011).

Se informó por primera vez en 2007 que los exosomas también contienen ARN (H et al., 2007). La composición y función de los exosomas se han investigado intensamente. Ahora se sabe que los exosomas llevan varios constituyentes

moleculares de su célula de origen, incluidas proteínas, lípidos, RNAm y microRNA (miARN). Los exosomas son eliminados por las células tanto en condiciones normales como patológicas. Transportan ácidos nucleicos y proteínas de sus células huésped que son indicativos de afecciones fisiopatológicas, y se considera que son cruciales para el descubrimiento de biomarcadores para el diagnóstico clínico (Lin et al., 2015). Se liberan de diferentes tipos de células, como células dendríticas (DC), linfocitos, plaquetas, mastocitos, células epiteliales, células endoteliales y neuronas, también se pueden encontrar en la mayoría de los fluidos corporales, incluidos sangre, orina, saliva, líquido amniótico, leche materna, líquido hidrotorácico y líquido ascítico, así como en el medio de cultivo de la mayoría de los tipos de células (Théry et al., 2009), (Camus et al., 2002). Inicialmente se pensó que los exosomas servían simplemente como "bolsas de basura" para que las células se deshagan de los componentes no deseados. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado en diferentes estudios que los exosomas juegan un papel importante en la comunicación de célula a célula e influyen tanto en los procesos fisiológicos como patológicos. Además, se ha descubierto que los componentes moleculares de los exosomas están asociados con determinadas enfermedades y respuestas al tratamiento, lo que indica que también pueden servir como herramienta de diagnóstico (Kalluri & LeBleu, 2020).

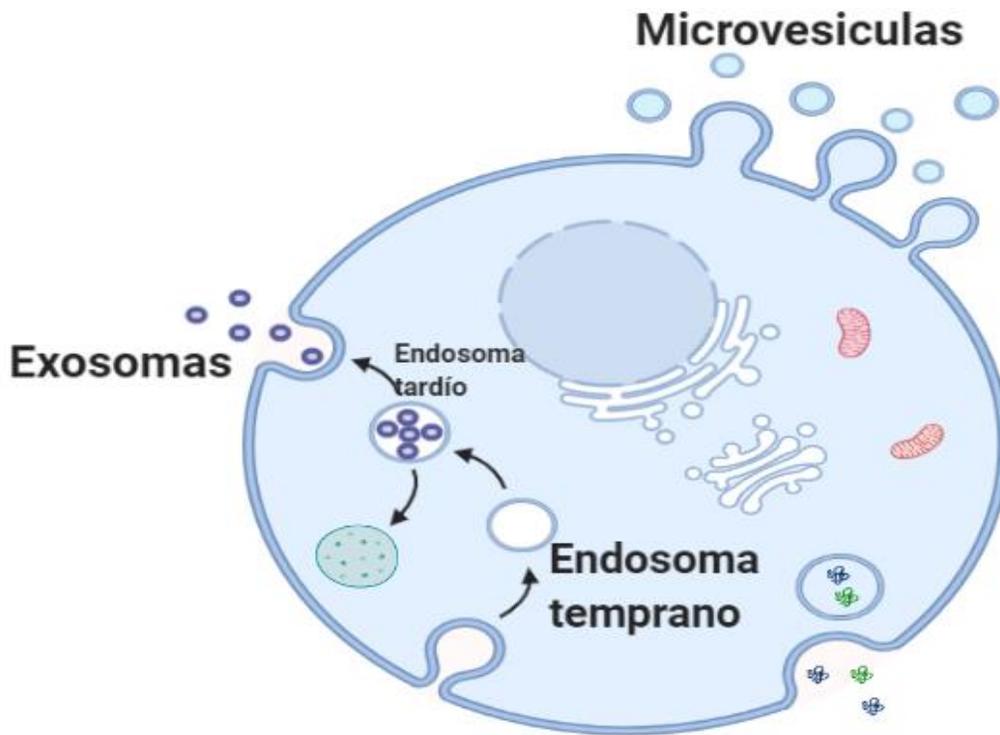


Figura 2. Biogénesis de los exosomas. Vía endosomal. La biogénesis de los exosomas comienza con la brotación interna de pequeñas partes de la membrana plasmática. Estas pequeñas vesículas intracelulares forman el endosoma temprano. Luego, se produce la formación de vesículas intraluminales por gemación interna de la membrana limitante del endosoma, cuando el endosoma contiene a vesículas intracelulares de denomina endosoma tardío. Por exocitosis se liberarán al medio extracelular.

Los exosomas tienen una composición única y compleja. La última base de datos de contenido de exosomas, se han identificado 4.563 proteínas, 194 lípidos, 1.639 mRNA y 764 miARN en exosomas de múltiples organismos (Mathivanan et al., 2012). Las proteínas identificadas con mayor frecuencia en los exosomas son transportadores de membrana y proteínas de fusión, proteínas de choque térmico, tetraspaninas, proteínas de biogénesis de MVB, y proteínas y fosfolipasas relacionadas con los lípidos (Conde-Vancells et al., 2008). Varias proteínas son reconocidas como marcadores exosomales específicos, entre los que las tetraspaninas, CD63 y CD81, son las más utilizadas. Los exosomas también son ricos en lípidos, que son predominantemente colesterol, esfingolípidos, fosfolípidos y bisfosfatos. El descubrimiento de que los exosomas también contienen RNAm y miARN indica que los exosomas podrían ser portadores de información genética

(Subra et al., 2010). Aunque la mayoría de los RNA que se encuentran en los exosomas son fragmentos de RNA degradados con una longitud de menos de 200 nucleótidos, algunos RNA de longitud completa pueden estar presentes y pueden transportarse a una célula receptora mediante endocitosis y afectar potencialmente la producción de proteínas en la célula receptora. Mientras tanto, se ha encontrado que los miARN exosomales están asociados con ciertas enfermedades.(Chadalawada et al., 2022) Por ejemplo, varios estudios han observado que los contenidos de miARN de los exosomas circulantes son similares a los de sus células cancerosas de origen, lo que sugiere que los miARN exosomales tienen potencial para el diagnóstico del cáncer (Taylor & Gercel-Taylor, 2008). Adicionalmente, un número creciente de estudios ha mostrado que los miARN pueden detectarse en exosomas aislados de fluidos corporales obtenidos de forma no invasiva, como la saliva, lo que muestra las ventajas potenciales de los miARN exosomales como nuevos biomarcadores (Seung et al., 2009), (Subra et al., 2010).

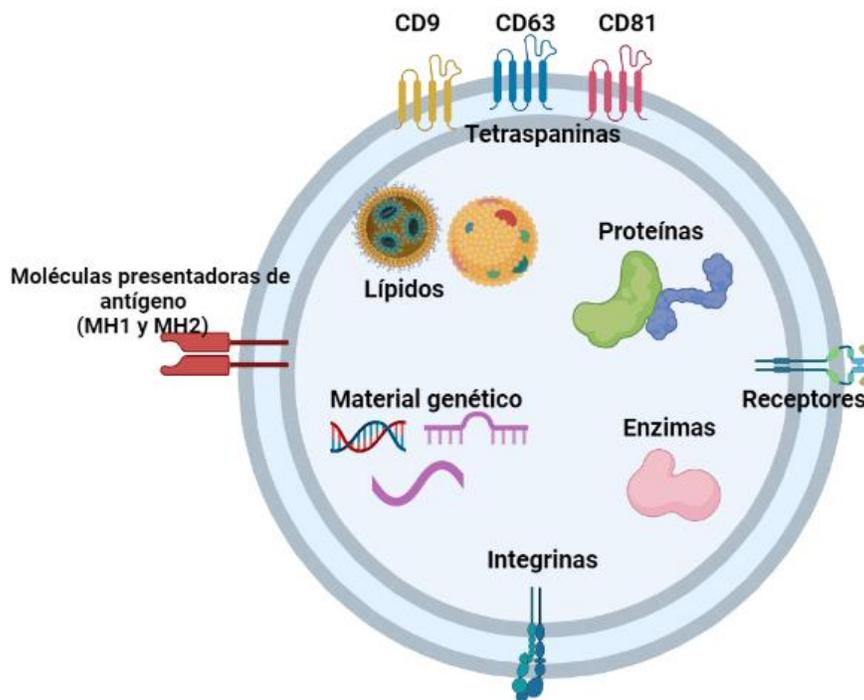


Figura 4. Composición general de exosomas

3.8.2 Exosomas y *M. tuberculosis*

Por parte de la biogénesis entre los exosomas y *M. tuberculosis*, se encontraron dos modelos propuestos. Por una parte, uno predice que los componentes de la pared celular son liberados por *M. tuberculosis* dentro de un fagosoma y se insertan en las membranas del huésped, por último, se transportan a los exosomas, donde se incorporan en vesículas de inclusión (alternativamente las vesículas podrían formarse por mecanismos análogos dentro de los fagosomas) (Subra et al., 2010). Los exosomas que llevan moléculas de *M. tuberculosis* se liberan luego por exocitosis tras la fusión de MVE con la membrana plasmática y por otra parte se encontró que *M. tuberculosis* utiliza la liberación de BMV como mecanismo para exportar moléculas de *M. tuberculosis*. Los BMV son producidos por bacterias intracelulares dentro del fagosoma, dispersas a través del sistema endocítico de la célula infectada y exocitadas de una manera similar a los exosomas (Athman et al., 2015).

3.8.3 miARNs como biomarcadores

Los microRNA (miARN) son moléculas de RNA no codificante de 19 a 22 nucleótidos de longitud que regulan postranscripcionalmente la expresión génica mediante el emparejamiento de bases con la región 3' no traducida de las dianas de RNA mensajero complementario. (Hotamisligil et al., 1993)

Los miARN se transportan en los fluidos corporales dentro de los exosomas, que son vesículas derivadas de células pequeñas que funcionan en los procesos de comunicación intercelular. Una vez liberados en el líquido extracelular, los exosomas se fusionan con otras células y les transfieren su carga. (, 2009)

La biogénesis de microRNA es un proceso de dos pasos que involucra un evento nuclear y uno citoplasmático. Los genes de microRNA se transcriben en el núcleo mediante la ARN polimerasa II o III. La transcripción primaria larga, conocida como

pri-miR, tiene una gran estructura de bucle de tallo flanqueada por extremos de ARN monocatenario. El procesamiento de pri-miARN implica la escisión nuclear de ambos extremos por el complejo de proteínas "microprocesador" compuesto por Drosha, una endonuclease de RNasa tipo III y varios cofactores. Estos cofactores incluyen la proteína de unión a ARN bicatenaria del síndrome de DiGeorge, región crítica 8 (DGCR8). El procesamiento de pri-miARN da como resultado la generación de una estructura de horquilla corta de 70 a 90 nucleótidos denominada precursora del miR maduro (pre-miR). Los pre-miARN se trasladan posteriormente desde el núcleo al citoplasma a través de un proceso activo que involucra exportin-5. En el citoplasma, el pre-miARN se incorpora a un complejo de procesamiento de pre-miARN compuesto por Dicer, la proteína de unión al RNA de respuesta trans-activante del virus de la inmunodeficiencia humana (TRBP) y Ago2. Este complejo escinde el pre-miARN para dejar un miARN dúplex bicatenario de 19-25 nucleótidos. Una de estas hebras forma la hebra madura de miR (o hebra guía) y la otra forma una hebra pasajera (o hebra de miARN *) con el miARN generalmente degradado (Wahid et al., 2010). El miR maduro monocatenario se incorpora posteriormente al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). El complejo RISC cargado permite que los miARN reconozcan secuencias complementarias ubicadas en las regiones 3' no traducidas (3'-UTR) de los RNAm diana y promueve la inhibición o degradación de la traducción del RNAm. Estudios anteriores han demostrado que las 3'UTR en los sitios diana de RNAm tienen un papel importante en las interacciones miARN: RNAm. Los genes con 3'-UTR más largos suelen tener una mayor densidad de sitios de unión a miARN, mientras que los genes con 3'-UTR más cortos suelen tener una baja densidad de sitios de unión a miARN. (MacFarlane & Genomics, 2010).

Los miARN exosomales pueden tener funciones importantes en la comunicación célula-célula y tienen potencial como biomarcadores para detectar y monitorear enfermedades. (Manna et al., 2020).

Los miARN tienen un papel central en la regulación de la expresión de proteínas clave que controlan el tipo y la magnitud de las respuestas inmunes observadas. Los microRNA son modificadores importantes del sistema inmunológico y regulan los mecanismos de defensa humanos. Investigaciones recientes revelaron funciones centrales de los miARN en diferentes aspectos de la patogenia de la inflamación y la enfermedad (Sinigaglia et al., 2020).

El descubrimiento de que los exosomas contienen RNA ha despertado un gran interés en la investigación de los RNA exosomales, especialmente los miARN como biomarcadores de diagnóstico (Singh et al., 2015).

3.8.4 miRNAs y *M. tuberculosis*

Se ha revelado que los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* pueden liberar miARN particulares empaquetados en exosomas en el espacio extracelular. Se ha demostrado que los macrófagos derivados de monocitos (MDM) infectados por *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) pudieron encontrar miARN exosomales específicos, incluidos *miR-1224*, *miR-1293*, *miR-42*, *miR-4467*, *miR-4732*, *miR-484*, *miR-5094*, *miR-6848*, *miR-6849*, *miR-4488* y *miR-96* (Alipoor et al., 2019). En otro estudio descubrieron que la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos podría suprimir la encapsulación de miARN específicos en exosomas y que estos miARN parecían regular genes diana relacionados con la vigilancia inmunológica, así como la inflamación. (Prachi Pratap Singh et al., 2015). También se informó que los exosomas de los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* contenían un conjunto de miARN y ARN micobacterianos únicos del hospedero que desempeñaban funciones en el proceso de infección por *M. tuberculosis* y servían como biomarcadores de diagnóstico para la tuberculosis.

Algunos estudios han explorado la utilidad de los miARN exosomales sanguíneos como biomarcadores de diagnóstico de la tuberculosis. En otro estudio eligieron los *miR-484*, *miR-425* y *miR-96* como biomarcadores de diagnóstico para evaluar

su valor diagnóstico de TB y encontraron que los niveles de expresión de los tres miARN exosomales séricos estaban estrechamente relacionados con la extensión de la infección por TB, que se definió de acuerdo con el grado de positividad del frotis (Alipoor et al., 2019). Del mismo modo, un estudio de Lyu et al. compararon los perfiles de los miARN exosomales séricos entre pacientes con infección tuberculosa latente (LTBI), pacientes con infección tuberculosa activa e individuos sanos, y sus resultados mostraron que cuatro miARN exosomales (*hsa-let-7e-5p*, *hsa-let-7d-5p*, *hsa-miR-450a-5p* y *hsa-miR-140-5p*) se expresaron específicamente en el grupo LTBI, mientras que cinco miARN exosomales (*hsa-miR-1246*, *hsa-miR-2110*, *hsa-miR-370-3P*, *hsa-miR-28-3p* y *hsa-miR-193b-5p*) séricos han sido propuestos como biomarcadores de diagnóstico de la tuberculosis latente y tuberculosis activa (Lyu et al., 2019). Otro estudio muestra que seis miARN exosomales plasmáticos (*miR-20a*, *miR-20b*, *miR-26a*, *miR-106a*, *miR-191* y *miR-486*) mostraban diferencias de expresión significativas entre pacientes con tuberculosis (Hu et al., 2019).

4 Pregunta de investigación

¿Es posible utilizar como biomarcadores a los miARNs exosomales séricos secretados por el hospedero para evaluar la eficacia del tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar?

5 Justificación

Las principales causas de atención de tuberculosis pulmonar en el INER son la tuberculosis multifarmacoresistente y la tuberculosis concomitante con diabetes mellitus tipo 2. Debido a que hasta el día de hoy no se cuenta con biomarcadores efectivos para el monitoreo del tratamiento farmacológico en estos grupos de pacientes. En este trabajo se propone realizar una evaluación de una matriz de 180 miRNAs para identificar micro ARNs (miARNs) generados en el pulmón por el hospedero en respuesta a *M. tuberculosis* y transportados a la sangre dentro de

exosomas. Esta evaluación nos permitirá identificar biomarcadores del hospedero (para monitorear la respuesta al tratamiento una vez que el patógeno es eliminado durante la terapia).

Encontrar un biomarcador permitirá en el futuro identificar fallas farmacológicas tempranas, lo que a su vez permitirá tomar medidas de intervención terapéuticas en estos pacientes de difícil re-tratamiento. Esta técnica puede ser útil para monitorear terapias individualizadas en aquellos pacientes en los que no es efectiva una terapia estandarizada.

6 Hipótesis

Un biomarcador para identificar de fallas farmacológicas durante el tratamiento en pacientes con tuberculosis multifármacorresistente son los miRNAs exosomales secretados por el hospedero

7 Objetivos

7.1 Objetivo principal

Identificar los miARNs exosomales de suero de pacientes con tuberculosis multifármacorresistente (TB-MFR) que correlacionen con la eficacia al tratamiento a los 0, 3, 6 y 12 meses de terapia

7.2 Objetivos particulares

1. Evaluar un set de 180 miARNs expresados en humanos a partir del mRNA extraído de exosomas de pacientes con TB-MFR y TB-MFR-DM2 antes de iniciar el tratamiento y a los 3, 6 y 12 meses después de iniciado el tratamiento para identificar biomarcadores diferencialmente expresados.

2. Correlacionar los miARNs exosomales del hospedero con los tiempos de tratamiento farmacológico a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento para proponer posibles biomarcadores candidatos asociados a la terapia exitosa.

8 Métodos

8.1 Grupo de estudio

Entre el año 2010 y 2018 se estudiaron 26 pacientes con tuberculosis farmacorresistente, entre los cuales están incluidos pacientes con cepas resistentes a la rifampicina (RR), (MFR) y extremadamente resistentes (XDR). La TB fue confirmada bacteriológicamente por baciloscopia y cultivo de *M. tuberculosis* en cuyas pruebas de susceptibilidad existía resistencia a los fármacos de primera línea isoniazida (H) y rifampicina (R). El diagnóstico de DM2 se realizó de acuerdo con la clasificación de la asociación americana de diabetes (ADA) y los pacientes estaban bajo terapia de observación directa. Se incluyeron 16 sujetos clínicamente sanos para comparar la expresión antes del tratamiento.

Para la realización de este proyecto se dispone de las muestras biológicas de los pacientes en un banco de sueros en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. De cada paciente se tomó una muestra de sangre en cada visita de seguimiento. Esta muestra se centrifugó para obtener suero. Además, se incluyeron 16 voluntarios sanos como grupo de control y sus muestras se procesaron de la misma manera. Las muestras fueron obtenidas durante el desarrollo de protocolos previos y en donde se solicitó al paciente su autorización para conservar las muestras para la realización de proyectos de investigación futuros, mediante una carta de consentimiento informado (se cuenta con la carta de consentimiento), los protocolos fueron autorizados por el Comité de Ciencia y Bioética del INER (C44-17).

8.2 Aislamiento de exosomas.

Los exosomas se purificaron del suero utilizando la solución de precipitación de exosomas Exo-Quick™ (System Biosciences, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, con un paso previo de filtración con un filtro de 0,22 µm. En resumen, el filtrado de suero se centrifugó a 3000 g y se agregó e incubó la solución de precipitación de exosomas ExoQuick™, luego se centrifugó a 1500 g. Los exosomas o EV se obtuvieron a partir de 300 µl de suero para realizar la extracción del ARN para el análisis de microARN. Los exosomas se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. (El procedimiento se llevó de acuerdo con el protocolo del fabricante)

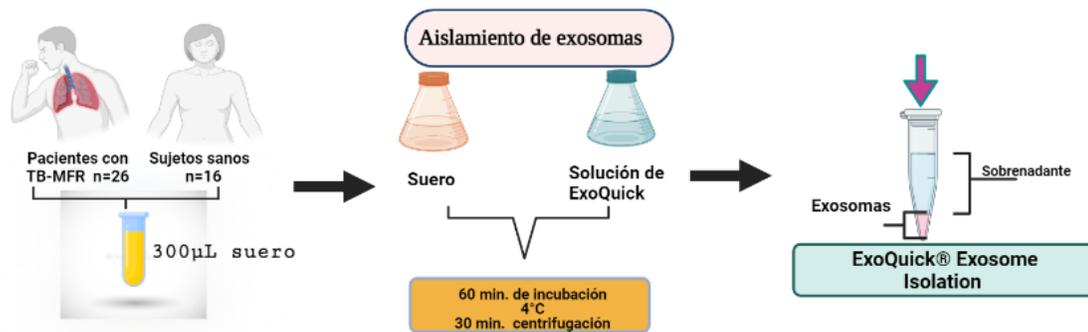


Figura 5. Esquema de aislamiento de exosomas siguiendo las indicaciones del fabricante.

8.3 Extracción de mRNA exosomal

A partir de exosomas aislados del suero de pacientes con TB-MFR, se hizo una extracción de los mRNA por la tecnología de separación magnética con perlas magnéticas MagMAX, lo que permitió la recuperación reproducible de ARN de alta calidad incluido miARN que fué adecuado para la amplificación de los miARN por qRT-PCR. El kit que se utilizó para este paso es MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (Thermo Fishers. Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Las muestras purificadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

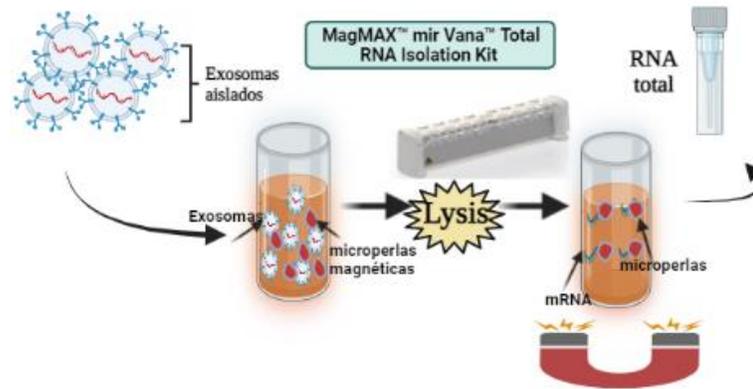


Figura 6. Esquema de aislamiento de mRNA de una muestra de exosomas aislados por ExoQuick.

8.4 Perfil de expresión de miARN exosomales

Para la amplificación de los miARNs se utilizará el kit de síntesis de ADNc de miARN TaqMan™ Advanced donde utiliza la formación de picos con colas de poli-A en el extremo 3' y la ligación en el extremo 5' de una secuencia de un adaptador para extender por cada extremo los miARN maduros presentes en la muestra antes de la transcripción inversa. Los cebadores universales de RT reconocen las secuencias universales presentes en los extremos ampliados 5' y 3' de los miARN maduros. Todos los miARNs maduros de la muestra se transcriben inversamente en ADNc y con el fin de mejorar la detección de los objetivos de miARN de baja expresión, el ADNc se amplifica mediante los cebadores miR-Amp universales y la mezcla maestra miR-Amp para aumentar de forma uniforme la cantidad de ADNc en cada objetivo y así, mantener los niveles relativos de expresión diferencial.

La Exploración y normalización de los datos de expresión de miARN (método Delta Ct) Los datos brutos de Ct se normalizaron utilizando el método Delta Ct. Para ello, el miRNA con la expresión más estable en todas las muestras fue seleccionado como calibrador utilizando el algoritmo gnorm (Vadessompele). Brevemente, este método compara iterativamente el valor medio de la expresión de miARN probados y selecciona aquellos con la desviación estándar más

pequeña, esto se define como valor de estabilidad M. Luego, para cada muestra restó el valor Ct del miARN más estable del valor Ct de los miARN restantes. Posteriormente se realizará el análisis de expresión diferencial entre condiciones (Sin tratamiento) Después de la normalización, realizamos una clase análisis de comparación o Delta-Delta Ct para determinar diferencias significativas en miRNAs expresión entre muestras de pacientes con TB y muestras de control. Se empleó la prueba t-sudent para ese propósito y cambia con un adjjuetd p-valor <0.05 fueron seleccionados como estadísticamente importante, ya que es actualmente el método más preciso para corregir los errores mencionados con anterioridad a la hora de cuantificar los miARNs. Un ideal miARN de control endógeno muestra una expresión génica que es relativamente constante. Los pasos en general para medir el nivel de expresión de los miARNs exosomales fue la siguiente.

TaqMan Advance miARN cDNA Syntesis (Kit Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, EE. UU)

Para la síntesis de ARN a cDNA se llevaron a cabo 4 pasos: La reacción de cola de poly(A), la reacción de ligación del adaptador, la reacción de transcripción inversa (RT) y la reacción de miR-Amp. El producto se almacenó el producto e la reacción miR-Amp sin diluir a 20°C.

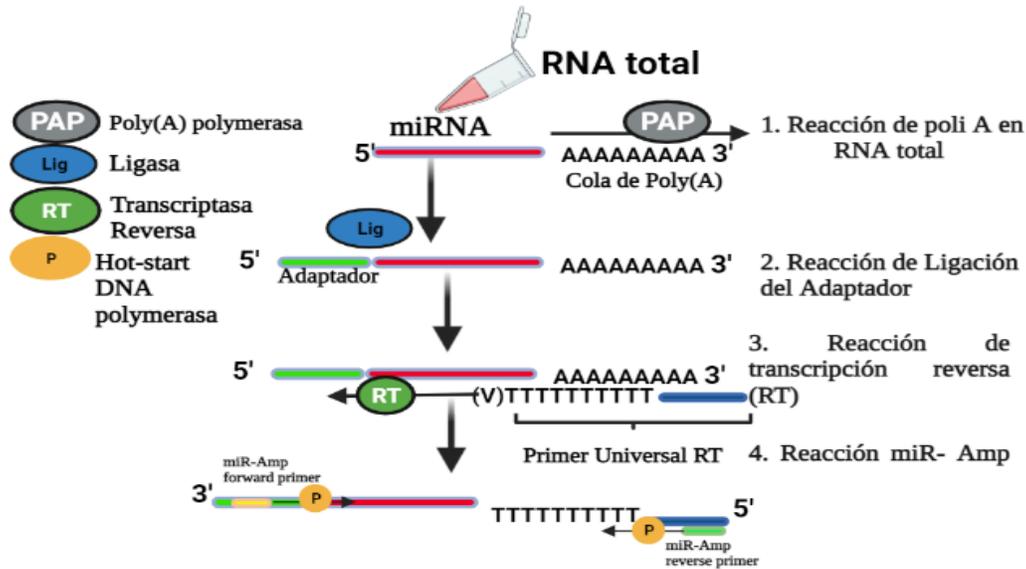


Figura 7. Esquema de síntesis de cDNA siguiendo los pasos del protocolo del fabricante.

8.5 Evaluación de la expresión de miARNs endógenos-normalizadores a partir de matriz exploratoria

La placa de 96 pocillos de controles endógenos humanos de miARN TaqMan™ Advanced (The Applied Biosystems TaqMan Advanced miRNA Human Endogenous Controls Card Applied Biosystems™ Cat: A34716) se utilizó para evaluar 32 miARN de control endógeno, incluidos dos controles exógenos (no humanos) para la normalización de la entrada de muestras. Brevemente, se realizó PCR mezclando TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y el conjunto de ADNc de cinco pacientes con TB-MDR antes del tratamiento (T0) o después de 12 meses de tratamiento (T12) y la mezcla se añadió a las placas. La qPCR se ejecutó en el instrumento Step One Plus de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

8.6 Evaluación de la expresión de miARN de exosomas a partir una matriz exploratoria

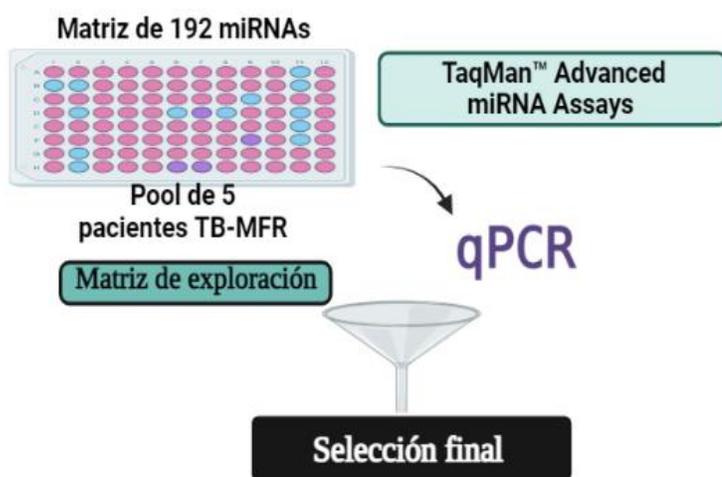
Utilizamos ensayos de miARN avanzados TaqMan premarcados en una placa rápida de 96 pocillos (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Este kit contiene dos placas para 188 miARN únicos para muestras de suero/plasma, 2 controles exógenos (cel-miR-39-3p, ath-miR159a) y un control endógeno (hsa-miR-16-5p) para la normalización de los resultados de los datos. Brevemente, la PCR se realizó mezclando la solución TaqMan Fast Advanced Master Mix y el grupo de ADNc de cinco pacientes con TB-MDR en T (0) o T (12), y se agregó a las placas con los valores recomendados por el fabricante.

8.7 Evaluación individual de miARNs exosomales en pacientes con TB-MFR a partir de matrices exploratorias.

Para la validación individual, seleccionamos ocho miARN: dos expresados endógenamente en Ct<25, tres miARN expresados en T (0) y con expresión descendente después de 12 meses con Ct<32, y tres miARN no expresados en T(0) y expresado en T(12) con Ct<35. En resumen, se evaluó el ADNc para la expresión de miARN individuales en cuatro momentos diferentes: T (0), T (3-5), T (5-8) y T(9-15), cuando se mezcló con TaqMan Fast Advanced Master Mix y la

sonda específica para ensayos de microARN (Custom TaqMan® . Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, CA, EE. UU.).



Análisis individual de 8 miRNAs en 26 pacientes TB-MFR y 16 sanos en T(0), T(3-5),T(6-8),T(9-12)

Figura 8. Esquema de la evaluación de miARNs en la matriz exploratoria e individual.

8.8 Análisis de los datos

Se observaron las gráficas de amplificación y se establecieron los valores del umbral del ciclo (Ct).

8.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la PCR en tiempo real se obtuvieron de manera individual y por duplicado un valor de C T (Umbral del ciclo) de cada miARN analizado. Primero se realizará el promedio de los valores en cada paciente por cada tiempo. Posteriormente se utilizaron este valor para hacer el cálculo de la expresión de cada miARN utilizando el método delta Ct, utilizando el valor de Ct de un miARN endógeno como factor de corrección. El método delta Ct utiliza la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen de referencia (endógeno-normalizador)}$$

Después de obtener el valor del Ct de cada miARN normalizado, los niveles de expresión de los miARN entre pacientes con TB-MFR y sujetos sanos, se analizan con una prueba no paramétrica con la U de Mann-Whitney de dos colas, los datos se considerarán significativamente diferentes con una $P < 0,05$. Para identificar los miARN asociados a la eficacia del tratamiento, los datos de los pacientes con TB-MFR antes del tratamiento, a los 3, 6 12 meses del tratamiento, se compararán con la prueba de Wilcoxon signed rank de dos colas, la diferencia entre datos se considerará significativa cuando $P < 0,05$.

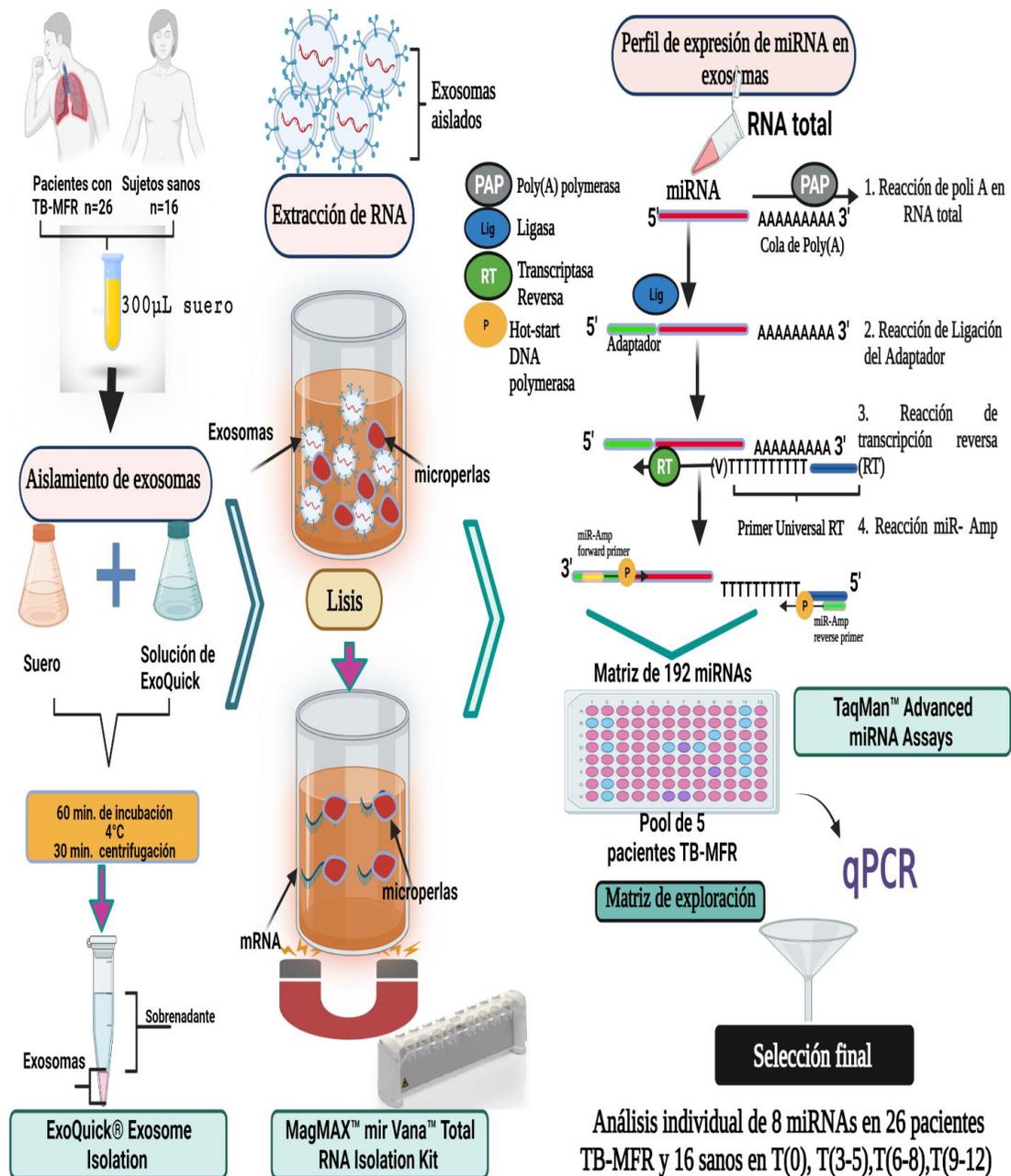


Figura 9. Metodología. Síntesis de metodología.

9 Resultados

9.1 Descripción de grupo de estudio

Se analizaron de 26 pacientes con diagnóstico de TB-MFR que acudieron a atención al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). La TB-MFR fue confirmada bacteriológicamente por baciloscopia y cultivo de *M. tuberculosis* en cuyas pruebas de susceptibilidad existía resistencia a los fármacos de primera línea izoniacida (H) y rifampicina (R).

En la muestra (**tabla 2**) el grupo donde se observó que la TB-MFR es más frecuente en los hombres, ya que, de 26 personas, 18 son hombres y 8 son mujeres. El grupo etario es entre 36 a 65 años, con 11, seguido del grupo de 18 a 35, con 9 personas.

La principal comorbilidad en pacientes con TB-MFR es la DM2, con un 50% de la muestra total. El 50% presentan algún tipo de alteración en el índice de glucosa, ya sea hipoglucemia (10.7%), glucosa elevada (21.4%) o glucosa altamente elevada (17.9%). El segundo factor de riesgo más elevado aparte de la DM2 es la hipertensión arterial sistémica con 21.4%, seguido del alcoholismo con un 17.9% de las personas con la enfermedad, y la desnutrición con 10.7% (**Tabla 2**). El resto de las comorbilidades encontradas y reflejadas en la (**Tabla 2**).

Tabla 2. Datos demográficos y clínicos de pacientes con TB-MFR

Características	Número	Porcentaje
Total	26	100%
Sexo		
Femenino	8	34.8%
Masculino	18	65.2%
Edad (años)		
18-35	9	34.6%
36-65	13	50.0%
>65	4	1.53%
*Glucosa		
Hipoglucemia (<80 mg/dl)	2	8.69%
Rango aceptable (80-115mg/dl)	12	52.17%
Elevado (115-180mg/dl)	7	33.33%
Altamente elevado (>180mg/dl)	2	8.69%
*Hemoglobina glucosilada		

Dentro de parámetro aceptable (<5.7%)	14	60.86%
Prediabetes (5.7%-6.4%)	2	8.69%
Diabetes (>6.5%)	7	30.43%
*Urea (10-40 mg/dl)		
Dentro de parámetro aceptable	22	95.65%
Fuera de parámetro aceptable	1	4.55%
*Ácido úrico (3-7 mg/dl)		
Dentro de parámetro aceptable	21	91.30%
Fuera de parámetro aceptable	2	8.70%
*Albúmina (3.4-5.4 mg/dl)		
Dentro de parámetro aceptable	23	100%
Fuera de parámetro aceptable	0	0%
*Alcoholismo		
	9	34.61%
**Comorbilidades		
Diabetes DM2	9	34.61%
Hipertensión Arterial Sistémica	1	4.34%
Desnutrición	15	57.76%
Insuficiencia Renal Crónico	1	4.34%
VIH	2	8.70%
Otros	8	34.78%
*Daño auditivo		
Inicio de tratamiento	7	21.74%
Termino de tratamiento	18	78.26%
*Tipo de tratamiento		
Individualizado	16	69.56%
Estandarizado	7	30.44%

*Algunos pacientes no tenían el dato en su expediente, **Algunos pacientes presentaban más de una comorbilidad.

9.2 Análisis de miARNs endógenos-normalizadores

El objetivo de la mayoría de los experimentos con miRNAs mediante qPCR es identificar las diferencias de expresión entre dos grupos de muestras, normalmente un grupo de muestras (control) y otra muestra de paciente o tratado (prueba). El propósito de la normalización es eliminar cualquier diferencia entre estos dos grupos que no sea la que sea una verdadera representación de los niveles de expresión de los miRNAs en el estado de paciente o por el tratamiento. Una estrategia de normalización ideal utiliza un miRNAs que se expresan de manera uniforme en el tejido o tipo de célula de interés y que demuestren una estabilidad de extracción y cuantificación equivalentes a las de la diana de interés.

Sin embargo, la identificación de miRNAs que cumplan estos criterios ha sido un reto. Los ARN pequeños de secuenciación de ARN pequeño y otros estudios de perfilado han revelado que de los miARNs varía mucho en los distintos tejidos y fluidos tejidos y fluidos corporales, por lo que no se puede utilizar un solo miRNA utilizar como "normalizador global" por lo cual se debe analizar diferentes miARNs endógenos- normalizadores en las muestras específicas a analizar.

Para encontrar un miARNs endógenos-normalizadores se utilizó un set de 31 miARNs humanos. Los miARNs se evaluaron en ensayos por triplicado, y se seleccionaron aquellos que se mantenían estables en un pool de miARN de cinco pacientes antes del tratamiento y después de 12 meses de tratamiento. De los 31 miARNs analizados, se observó que solo 3 miARNs (hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-93-5p y hsa-miR-25-3p) mostraban la expresión más estable con diferencias aproximadas de $\pm 1 C_T$ entre ambos tiempos, por lo que se considera que ninguno de esos 31 miARNs puede ser utilizado con endógeno-normalizador en los pacientes con TB-MFR.

9.3 Análisis de 180 miARNs en pacientes con TB-MFR para encontrar miARNs endógenos-normalizadores.

Posteriormente se analizó matriz que contiene 180 diferentes miARNs para identificar los miARNs diferencialmente expresados en un pool de muestra de cinco pacientes con TB-MFR. Los resultados mostraron que los miARNs miR-451a y el miR-223-5p se expresaron establemente antes ($CT= 21.85$ y 21.65 respectivamente) y después de 12 meses de tratamiento ($CT=25.41$ y 25.47 respectivamente) en pacientes con TB-MFR, que se mantenían estables en ambos tiempos y con un $Ct < 35$. Los resultados mostraron que hay dos posibles miRNAs endógenos (**Figura 10**):

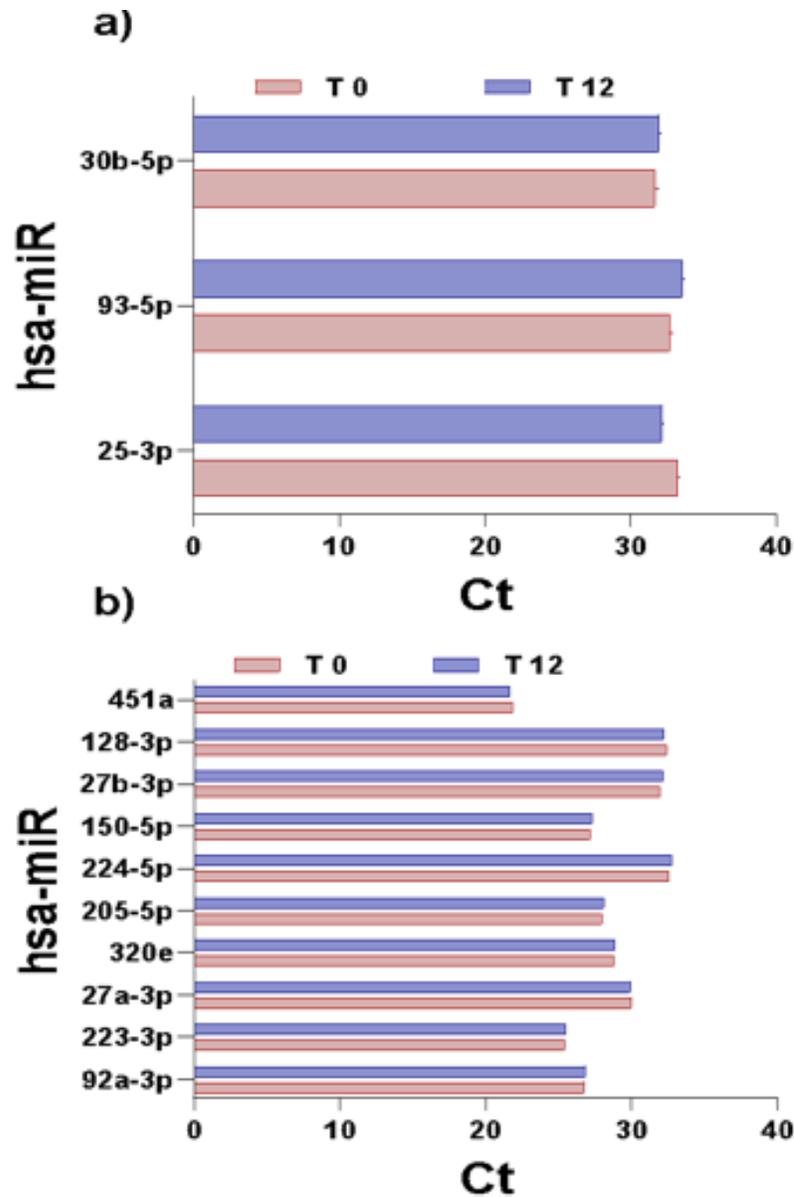


Figura 10. Evaluación de miARNs endógenos-normalizadores en pacientes con TB-MFR. a) Valores de expresión "Ct" (Umbral de ciclo) de 32 miARNs endógenos-normalizadores humanos en las muestras de pacientes antes (T0) y después de tratamiento (T12) evaluando un pool de muestras de pacientes con TB-MFR. **b)** Valores de expresión Ct (Umbral de ciclo) de miARNs evaluados en una placa de 180 miARNs antes (T0) y después de tratamiento (T12) evaluando un pool de muestras de pacientes con TB-MFR. Se consideró que los valores de Ct>35 estaban por debajo del nivel de detección del ensayo, por lo cual, los miARNs que tuvieran valores de Ct<35 no se consideraron para el estudio.

9.4 Selección de miARNs expresados diferencialmente en el T (0) y el T(12) en pacientes con TB-MFR

En el análisis anterior se identificaron 41 miARNs diferencialmente expresados con un Ct<35, de los cuales, 4 de los miARNs (9.8%), tienen una expresión al alta antes de tratamiento en pacientes con TB-MFR, mientras que 27 de los miARN (66%) tienen una regulación al alta después de tratamiento (12 meses). Por último, el 24% de los miARNs tienen una expresión constante en ambos tiempos (antes y después de tratamiento). Los 41 miARNs diferencialmente expresados de la matriz de exploración son los siguientes:

	miARNs	Figura
Regulados al alza antes de tratamiento	hsa-miR-20-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-543, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-18a-3p.	11 (a)
Regulados al alza después de tratamiento	hsa-miR-133-b, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-106b-3p, hsa-miR-373-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-Let-7e-5p- hsa-miR-197-3p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-33a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-140-5p hsa-miR-331-3p, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-142-5p, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-197-3p.	11 (b)
Regulados en ambos tiempos	hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-320e, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-451a.	12

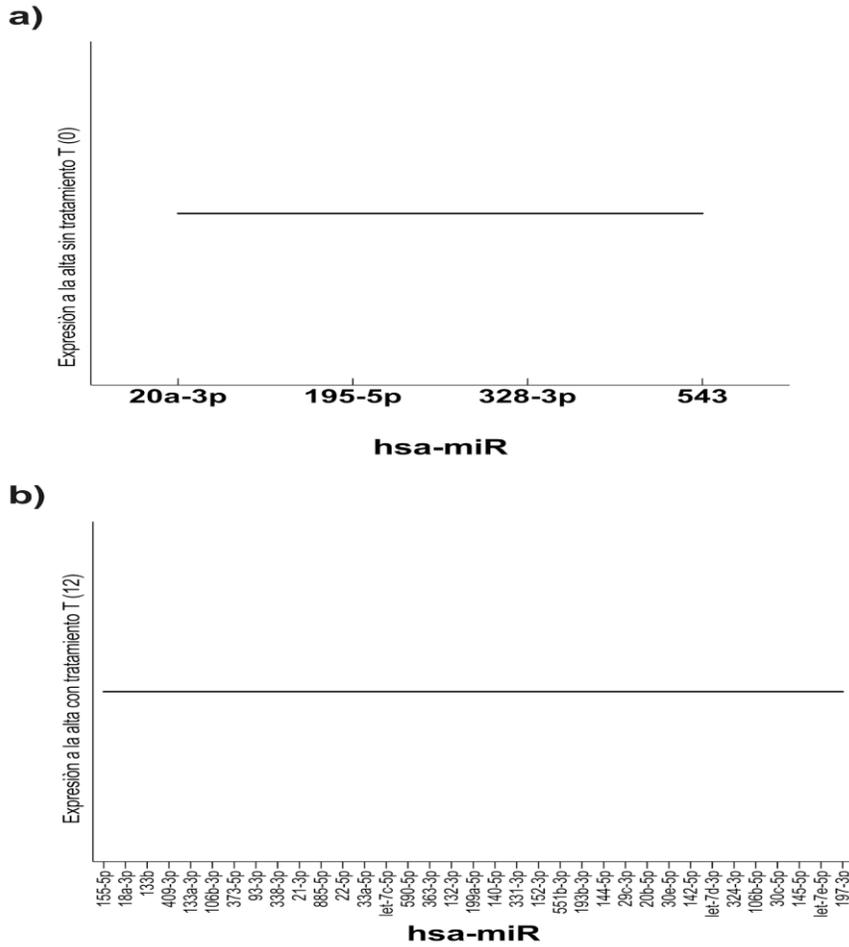


Figura 11. Evaluación de miARN diferencialmente expresados en pacientes con TB-MFR. Nivel de expresión Ct de miARN expresados antes del tratamiento **(a)**, después de tratamiento **(b)** de una placa de 180 miARN (TaqMan®Advanced miARN AssaysTaqMan®Array PlatesPub) de un pool de muestras de pacientes con TB-MFR. Los miARN que tuvieran valores de Ct<35 no se consideraron para el estudio.

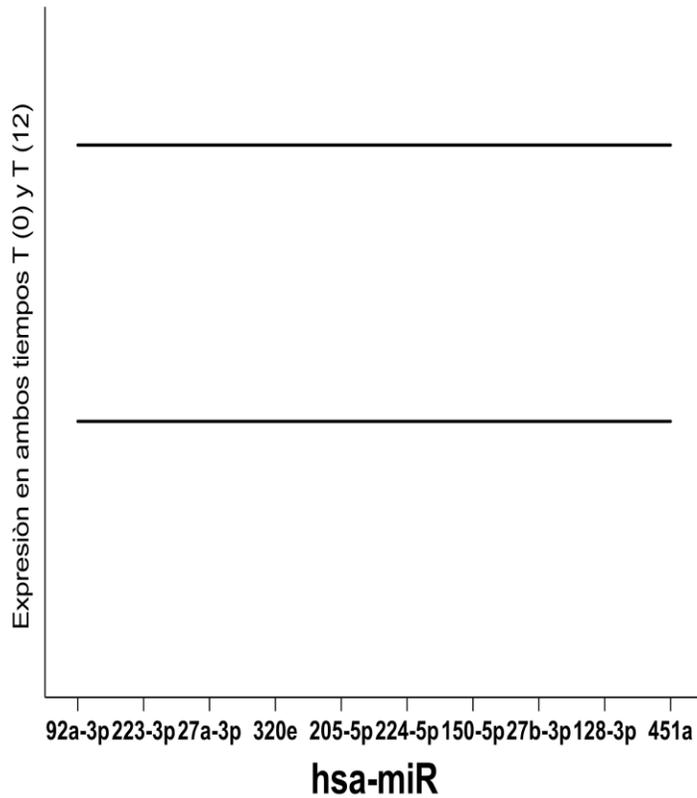


Figura 12. Evaluación de miARN diferencialmente expresados en pacientes con TB-MFR. Nivel de expresión Ct de miARN expresados antes y después de tratamiento de una placa de 180 miARN (TaqMan®Advanced miARN AssaysTaqMan®Array PlatesPub) de un pool de muestras de pacientes con TB-MFR. Los miARN que tuvieran valores de Ct<35 no se consideraron para el estudio.

Los miARNs expresados en los pacientes antes del tratamiento se muestran en la **Figura 13, a**, mientras los miARN expresados al alta después de 12 meses se muestran en la figura (**Figura 13, b**). Los miARNs fueron seleccionados por el criterio de exclusión Ct<35.

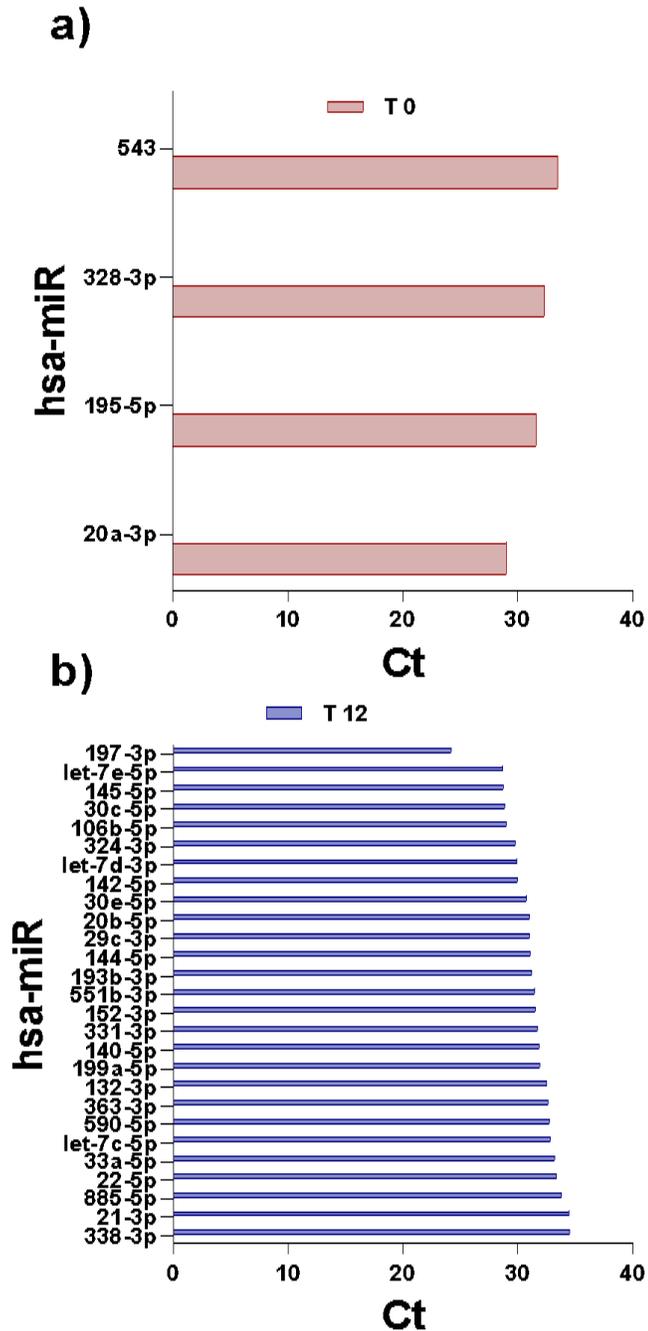


Figura 13. Evaluación de miARN diferencialmente expresados antes y después de tratamiento en pacientes con TB-MFR a) Nivel de expresión Ct (Umbral de ciclo) de miARN expresados antes de tratamiento (T0) de una placa con 180 miARN de un pool de muestras de pacientes con TB-MFR. b) Nivel de expresión Ct (Umbral de ciclo) de miARNmiARN expresados después de tratamiento (12 meses) (T12) de una placa con 180 miARNmiARN de un pool de muestras de pacientes con TB-MFR miARN (TaqMan®Advanced miARN AssaysTaqMan®Array PlatesPub. Los miARN que su valor de Ct<35 no fueron considerados para el estudio.

9.5 Selección de miARNs diferencialmente expresados en T0 vs T12 para la validación de su expresión en cada muestra.

La selección final se realizó con base a el Ct de expresión, es decir, los de mayor expresión o abundancia y que tuvieran una menor variación entre los duplicados. Los 8 miARNs seleccionados, incluyendo dos miARN endógenos-normalizadores son:

Regulación al alza antes de tratamiento	Regulación a la baja antes de tratamiento	miARNs endógenos normalizadores
hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-223-3p
hsa-miR-195-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-451-a
hsa-miR-328-3p	hsa-miR-197-3p	

9.6 Identificación de los miARNs diferencialmente expresados en pacientes con TB-MFR y sujetos sanos.

Los miARNs (hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-let-7e-5p y hsa-miR-197-3p) se evaluaron de manera individual en cada uno de los pacientes a los diferentes tiempos de tratamiento. Se determinó, por el grado de estabilidad en ambos tiempos, que el miARN **hsa-miR-145-5p** se tomaría como miARN endógeno-normalizador. Utilizando el valor del Ct de los miARNs y el Ct del miARN endógeno-normalizador (**hsa-miR-145-5p**) de cada paciente para eliminar cualquier diferencia entre estos dos grupos que no sea la que sea una verdadera representación de los niveles de expresión de los miRNAs en el estado de paciente o por el tratamiento; posteriormente se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ con el propósito de normalizar los datos. Como se mencionó anteriormente, se comparó los pacientes con TB-MFR sin tratamiento (T0) y sujetos sanos (n=16)

en cada uno de los miARNs para la evaluación de posibles biomarcadores para la enfermedad.

Los miRNAs diferencialmente expresados al alza o a la baja en pacientes con TB-MFR y sujetos sanos son:

miRNAs	Regulación diferencial en pacientes con TB-MFR	Figura
hsa-miR-223-3p	Regulado al alza (*)	14 (d)
hsa-miR-197-3p	Regulado a la baja (****)	15(d)
hsa-miR-328-3p	Regulado al alza (**)	16 (d)
hsa-Let-7e-5p	Regulado a la baja (*)	17 (d)
hsa-195-5p	Sin diferencias significativas	13 (d)

En resumen, se encontraron 4 miARNs como posibles biomarcadores de la enfermedad (TB-MFR), los cuales se encuentran diferencialmente expresados en los sanos, dos se desregulan y dos se sobre expresan durante la enfermedad.

9.7 Expresión de los hsa-miR-223-3p, hsa-miR-197-3p, hsa-miR-328-3p y Let-7e-5p durante el tratamiento de la TB-MFR.

Los miARNs fueron evaluados de manera individual a los 3, 6, 9 y 12 meses de tratamiento en los pacientes con TB-MFR y se comparó su expresión con T0 (antes del tratamiento) para encontrar un biomarcador que se asociará con los estados clínicos del paciente. Los miARNs que tuvieron diferencias significativas durante el tiempo del tratamiento son:

miRNA	T (0) – T (3-5)	T (0) – T (6-8)	T (0) -T (9-12)	Figura
hsa-miR-223-3p	Sin diferencias	Regulado al alza en T (6-8) *	Sin diferencias	15 a,b,c
hsa-miR-328-3p	Regulado a la baja en T (3-5) **	Sin diferencias	Sin diferencias	17 a,b,c
hsa- Let-7e-5p	Regulado al alza en T (3-5) **	Regulado al alza en T (6-8) *	Regulado al alza en T (9-12) *	18 a,b,c
El hsa-miR-195-3p y hsa-miR-197-3p no tuvieron una expresión diferencial en ninguno de los tiempos de tratamiento.				

En resumen, los posibles biomarcadores para el seguimiento del tratamiento en pacientes con TB-MFR son: dos miRNAs en T (3-5), dos miRNAs en T (6-8) y uno en T (9-12). El hsa-Let-7e-5p incrementa su expresión en los diferentes estados clínicos de los pacientes, por lo cual, podría considerarse como posible biomarcador de eficacia al tratamiento de la TB-MFR.

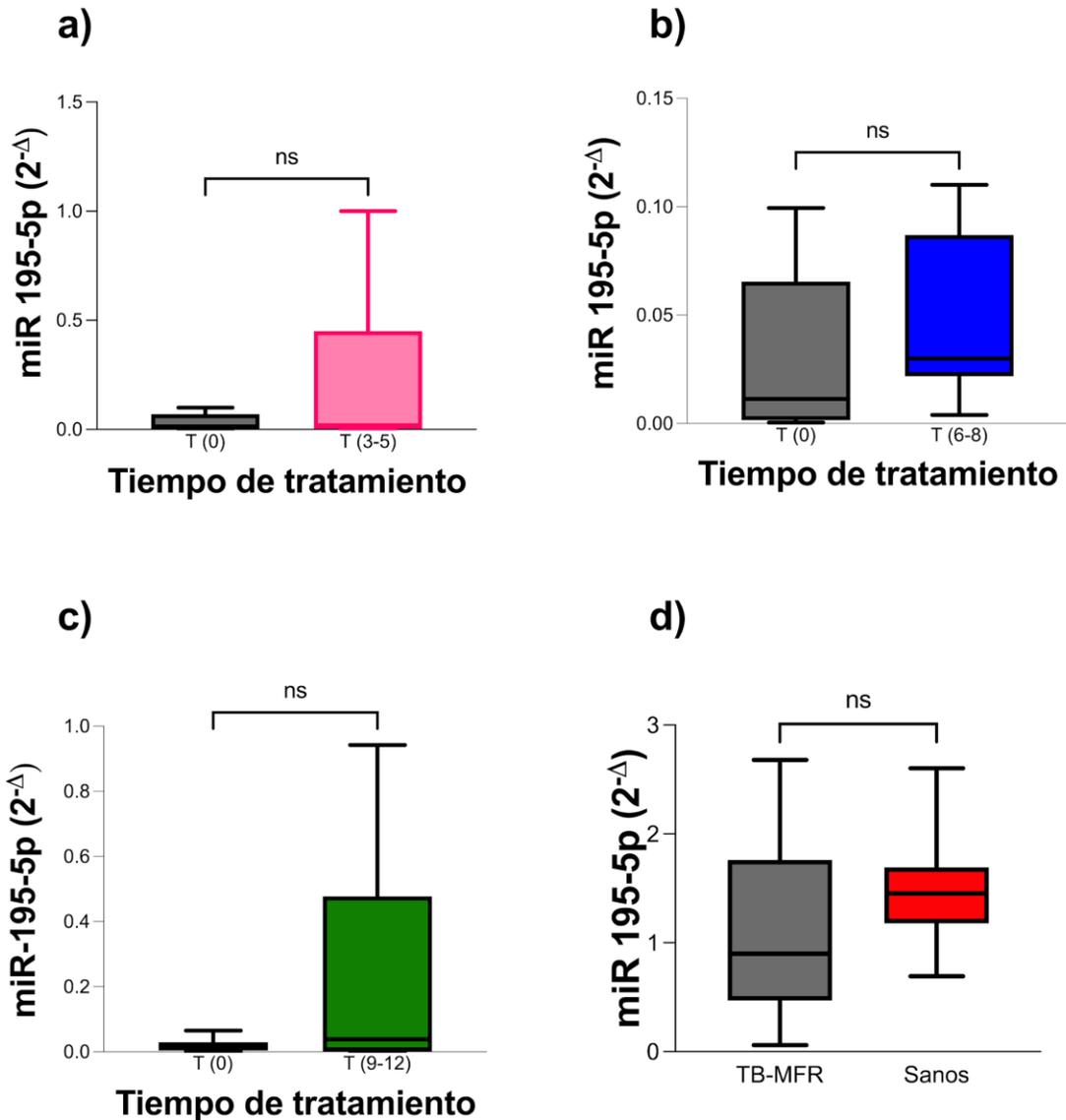


Figura 14. Expresión génica relativa de hsa-miR-195-5p. Comparación de expresión génica relativa de miR-195-5p en pacientes con TB-FR (n=18) y sujetos sanos (n=15) (a), tiempo de tratamiento (b) 3-5 meses (n=11), (c) 6-8 meses (n=11), (d) 9-12 (n=6). Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para normalizar los datos de expresión relativa usando el miR-145-5p como gen endógeno-normalizador. El nivel de expresión relativa del miARN entre pacientes con TB-MFR y sujetos sanos se realizó con una prueba para datos pareados, no paramétricos con la U de Mann-Whitney. Para la expresión del miARN asociado a la eficacia al tratamiento, a los 3, 6 o 12 meses de tratamiento se realizó con una prueba Wilcoxon signed Rank para datos pareados, no paramétricos con. Los datos se consideraron significativamente diferentes con una * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$., no significativo: ns.

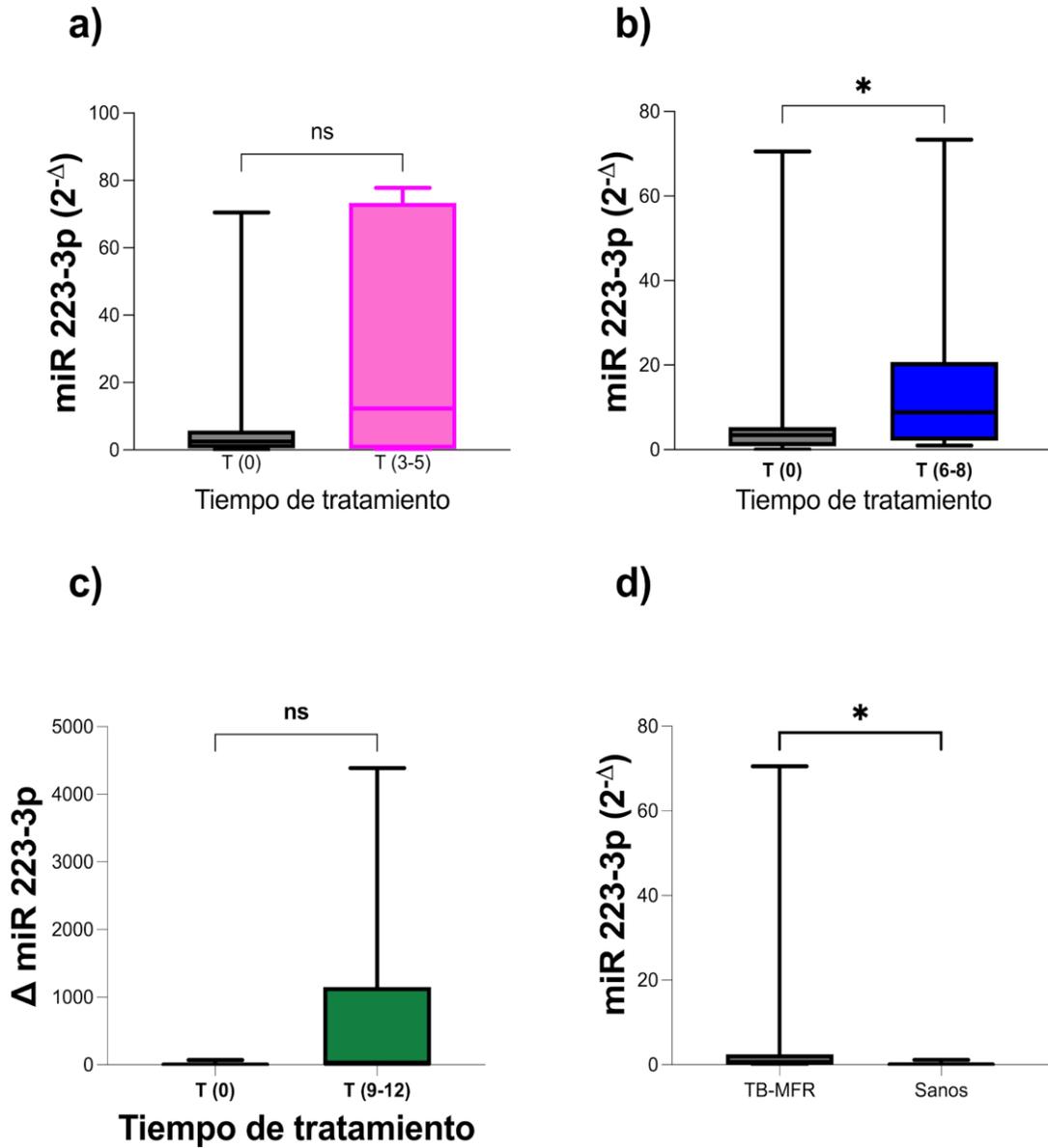


Figura 15. Expresión génica relativa de hsa-miR 223-3p. Comparación de expresión génica relativa de hsa-miR-223-3p en pacientes con TB-FR (n=18) y sujetos sanos (n=15) **(a)** 3-5 meses (n=9), **(b)** 6-8 meses (n=11), **(c)** 9-12 meses (n=6), **(d)** Pacientes TB-MFR y sujetos sanos. Se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ para normalizar los datos de expresión relativa usando el miR-145-5p como endógeno-normalizador. El nivel de expresión relativa del miARN entre pacientes con TB-MFR y sujetos sanos se realizó con una prueba para datos pareados, no paramétricos con la U de Mann-Whitney. Para la expresión del miARN asociado a la eficacia al tratamiento, a los 3, 6, 12 meses de tratamiento se realizó con una prueba Wilcoxon signed Rank para datos pareados, no paramétricos con. Los datos se consideraron significativamente diferentes con una * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$., no significativo: ns.

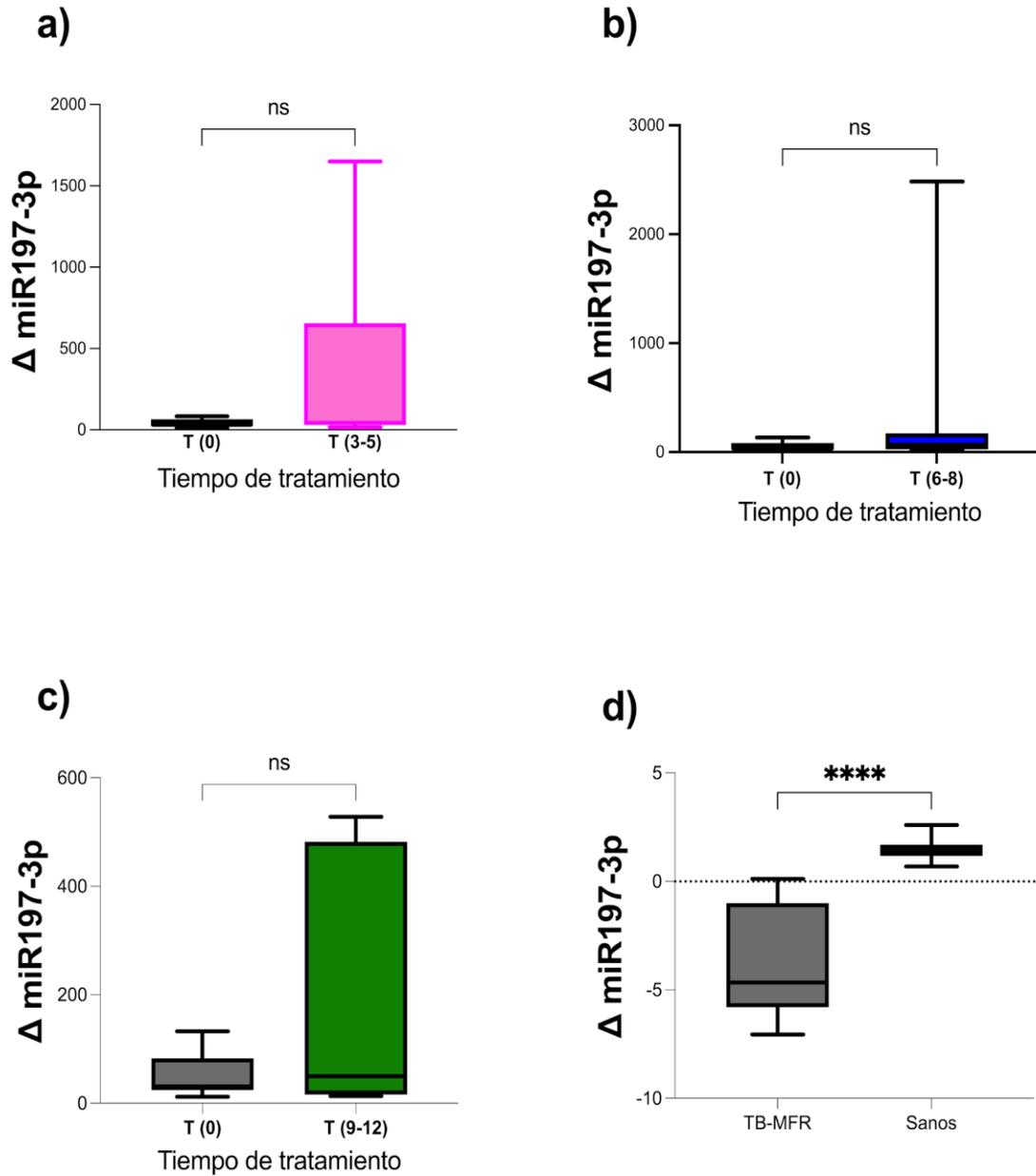


Figura 16. Expresión génica relativa de hsa-miR-197-3p. Comparación de expresión relativa de hsa-miR-197-3p en pacientes con TB-FR ($n=22$) y sujetos sanos ($n=16$) **(a)** Antes de tratamiento, **(b)** 3-5 meses ($n=9$), **(c)** 6-8 meses ($n=11$), **(d)** 9-12 meses ($n=7$). Se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ para normalizar los datos de expresión relativa usando el miR-145-5p como endógeno-normalizador. El nivel de expresión relativa del miARN entre pacientes con TB-MFR y sujetos sanos se realizó con una prueba para datos no pareados, no paramétricos con la U de Mann-Whitney. Para la expresión del miARN asociado a la eficacia al tratamiento, a los 3, 6, 12 meses de tratamiento se realizó con una prueba Wilcoxon signed Rank para datos pareados, no paramétricos con. Los datos se consideraron significativamente diferentes con una * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$., no significativo: ns.

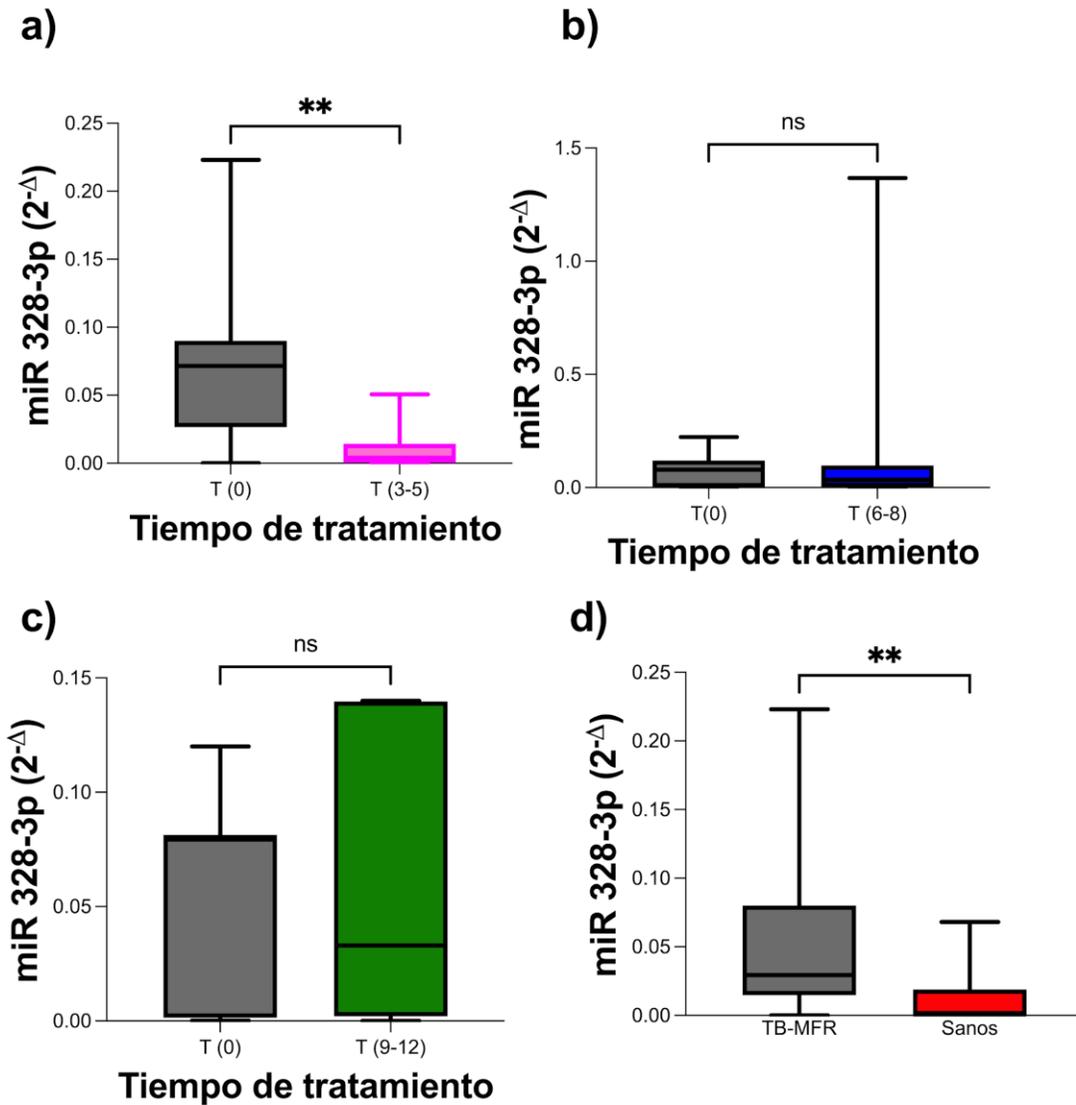


Figura 17. Expresión génica relativa de miR-328-3p. Comparación de expresión génica relativa de hsa-miR-328-3p en pacientes con TB-FR ($n=22$) y sujetos sanos ($n=16$) (a) Antes de tratamiento, (b) 3-5 meses ($n=9$), (c) 6-8 meses ($n=11$), (d) 9-12 meses ($n=6$). Se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ para normalizar los datos de expresión relativa usando el miR-145-5p como gen endógeno-normalizador. El nivel de expresión relativa del miARN entre pacientes con TB-MFR y sujetos sanos se realizó con una prueba para datos pareados, no paramétricos con la U de Mann-Whitney. Para la expresión del miARN asociado a la eficacia al tratamiento, a los 3, 6 o 12 meses de tratamiento se realizó con una prueba para datos pareados, no paramétricos con Wilcoxon signed Rank. Los datos se consideraron significativamente diferentes con una * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$., no significativo: ns.

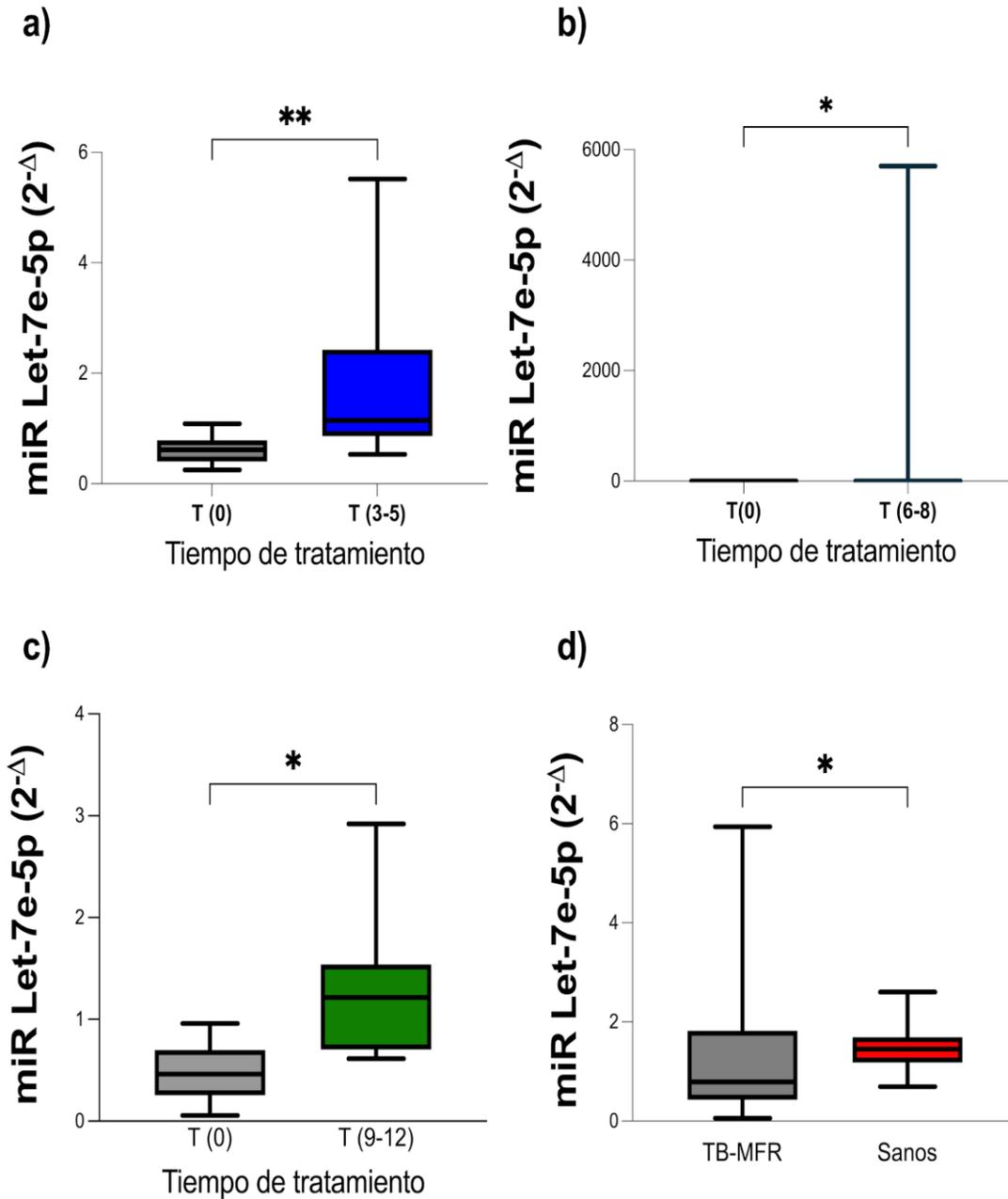


Figura 18. Expresión génica relativa de hsa-Let 7e-5p. Comparación de expresión génica relativa de hsa-Let-7e-5p en pacientes con TB-FR ($n=18$) y sujetos sanos ($n=16$) **(a)** Antes de tratamiento, **(b)** 3-5 meses ($n=9$), **(c)** 6-8 meses ($n=11$), **(d)** 9-12 meses ($n=8$). Se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ para normalizar los datos de expresión relativa usando el miR-145-5p como gen endógeno-normalizador. El nivel de expresión relativa del miARN entre pacientes con TB-MFR y sujetos sanos se realizó con una prueba para datos pareados, no paramétricos con la U de Mann-Whitney. Para la expresión del miARN asociado a la eficacia al tratamiento, a los 3, 6 o 12 meses de tratamiento se realizó con una prueba para datos pareados, no paramétricos con Wilcoxon signed Rank. Los datos se consideraron significativamente diferentes con una * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$., no significativo: ns.

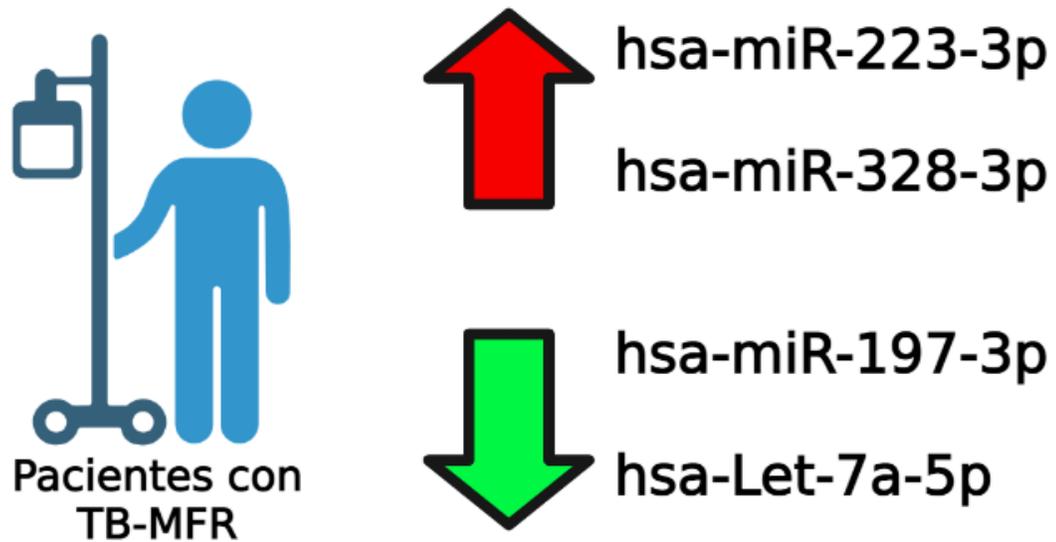


Figura 19. Representación gráfica de miARNs como biomarcadores de TB-MFR. Representación gráfica de los miARNs que están significativamente regulados al alza (flecha roja) o regulados a la baja (flecha verde) en pacientes con TB-MFR en comparación con sujetos sanos.

	 Sin tratamiento T (0)	 Con tratamiento
hsa-miR-223-3p		 T (3-5)
hsa-miR-328-3p		 T (3-5)
hsa-Let-7e-5p		 T (3-5), T (6-8) y T (9-12)

Figura 20. Representación gráfica de miARNs como biomarcadores del tratamiento en pacientes con TB-MFR. Representación gráfica de los miARNs que están significativamente regulados al alza (flecha roja) antes de tratamiento y regulados a la baja (flecha verde) a los 3-5 y 9-12 meses de tratamiento en pacientes con TB-MFR.

10 Discusión

En este trabajo se evaluaron ocho miARNs diferencialmente expresados en pacientes con TB-MFR antes del tratamiento y a los 12 meses de tratamiento, tres de los cuales mostraron una regulación al alza (hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-195-5p y hsa-miR-328-3p) y a la baja (hsa-miR-145-5p, hsa-let-7e-5p y hsa-miR-197-3p) antes de tratamiento. La sobreexpresión del hsa-miR-20-3p mejora significativamente la supervivencia de *M. tuberculosis* y reduce la secreción de citocinas inflamatorias en los macrófagos, por lo cual facilita la infección (Cui et al., 2021). Aunque en estudios anteriores se ha reportado que el miR-195-5p está

regulado al alza en macrófagos humanos M2 y se ha demostrado que los macrófagos M2 son abundantes en los tejidos pulmonares en pacientes con TB-MFR (Cho et al., 2020) y se le asocia con inhibición de la apoptosis, facilitando la liberación de patógenos intracelulares y la propagación de la infección por micobacterias (Feng et al., 2011), en este estudio no se encontró diferencias de su expresión cuando se compara con sujetos sanos o cuando se compara durante los tiempos de tratamiento.

Al igual que el miR-195-5p, el hsa-miR-451a se ha observado que limita las respuestas proinflamatorias de las células T CD4⁺, y se ha observado que tiene una participación al cambio de tuberculosis latente a tuberculosis activa (Xin et al., 2022),(Kundu & Basu, 2021), sin embargo, no se encontró diferencias de expresión con respecto a los sujetos sanos y/o en los pacientes durante los tiempos de tratamiento en este estudio.

Se ha reportado que el hsa-miR-328-3p regula la expresión del TGF- β , que a su vez está implicado en la supresión de la respuesta inmune durante la infección por *M. tuberculosis* (Chadalawada et al., 2022). También se ha observado que la expresión de TGF- β se incrementa en el espacio bronquiolo-alveolar de acuerdo con la progresión de la infección por *M. tuberculosis* (Cardona & Cardona, 2019). En este estudio encontramos que el hsa-miR-328-3p se encuentra incrementado en los pacientes con respecto a los sanos y permanece alto hasta el T (3-5), estado clínico en el cual las baciloscopias de los pacientes empiezan a ser negativas, es decir, cuándo el tratamiento empieza a reducir la carga bacteriana en los pulmones. Aunque hay una disminución del hsa-miR-328-3p en los siguientes meses, no hay un cambio significativo.

Respecto a la expresión del hsa-miR-223-3p, se ha reportado que induce la secreción de péptidos antimicrobianos como LL-37 (Pachathundikandi & Backert, 2018), debido a esto, es posible que lo observado en los resultados pueda asociarse con el control de *M. tuberculosis*, ya que la expresión en los pacientes

es mayor con respecto a los sujetos sanos y se mantiene alta en todos los tiempos de tratamiento siendo significativamente su expresión a los seis meses que es cuando se termina la fase intensiva del tratamiento con respecto al T (0) sin tratamiento.

La sobreexpresión de hsa-miR-197-3p se asocia con la inflamación, apoptosis y estrés oxidativo y estas vías ayudan a la eliminación de las micobacterias. Se sabe que hsa-miR-197-3p se une directamente al receptor de interleucina-1beta (IL-1 β), tipo I, una molécula clave de las vías inflamatorias (Akkaya-Ulum et al., 2021); así, hay una relación con hsa-miR-197-3p en el proceso de auto inflamación, lo cual contribuirá con la progresión de la enfermedad. Aquí se observó una disminución en la expresión del miR-197-3p antes de tratamiento que no se incrementa durante los 12 meses de tratamiento, por lo que no puede ser considerado como un posible biomarcador.

Por último, se ha observado que el hsa-let-7e-5p tiene una regulación al alza en la tuberculosis latente y está suprimido en la tuberculosis activa (Lyu et al., 2019b), también se ha observado que el hsa-Let-7e-5p tiene una participación en la activación las células inmunitarias (Wang et al., 2019), (Manna et al., 2020). Se encontró que en pacientes con TB-MFR el hsa-Let-7e-5p se encuentra disminuido en pacientes sin tratamiento con respecto a los sanos y en cada etapa clínica del paciente se incrementa significativamente, lo que podría sugerir su posible utilidad como biomarcador de eficacia al tratamiento.

En resumen, se encontró que los miR-223-3p, -328-3p y let-7e-5p correlacionan con el tiempo de negativización de la baciloscopia en pacientes con TB-MFR, estos biomarcadores podrían ser útiles en aquellos pacientes que tienen problemas para expectoras o en los niños, ya que no expectoran. Mientras que el miR-let-7e-5p se incrementa su expresión desde los tres meses y hasta el año de tratamiento, lo que sugiere su posible como biomarcador de una falla terapéutica en pacientes con TB-MFR.

Como limitaciones de este trabajo es el bajo número de pacientes, por lo que su evaluación con un mayor número podrá confirmar los hallazgos preliminares de este estudio.

11 Conclusión

Los miR-223-3p, -328-3p y -Let-7e-5p correlacionan con el tiempo en que las baciloscopias se vuelven negativas y el miR-let-7e-5p correlaciona con el tratamiento exitoso de la TB-MFR a los 12 meses de tratamiento. Dada la falta de métodos disponibles para la detección de fallas o recaídas de medicamentos, estos biomarcadores podrían ayudar a los médicos a realizar ajustes en los regímenes terapéuticos y mejorar el control de la TB en sus pacientes.

12 Perspectivas

Aunque estos datos son prometedores como biomarcadores para evaluar la eficacia del tratamiento en pacientes con TB-MFR y biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad, debemos corroborar su posible utilidad en un grupo mayor de pacientes, así como en otros tipos de tuberculosis como la, TB miliar, ganglionar o extrapulmonar para verificar su posible utilidad.

13 Referencias

- Arcos, M., Spinal, A. E., Dalbert, A., Aszlo, L., Adila, F., Oulahbal, B., Ang, S., Ae, J., Im, K., Eniero, N. R., Ven, S., Offner, H., Leder, A. L. R., Hristopher, C., Ye, D., Ario, M., & Aviglione, C. R. (2009). Global Trends in Resistance to Antituberculosis Drugs. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM200104263441706*, *344*(17), 1294–1303. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104263441706>
- Athman, J. J., Wang, Y., McDonald, D. J., Boom, W. H., Harding, C. V., & Wearsch, P. A. (2015). Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of Mycobacterium tuberculosis Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages . *The Journal of Immunology*, *195*(3), 1044–1053. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1402894>
- Bras, J. P., Silva, A. M., Calin, G. A., Barbosa, M. A., Santos, S. G., & Almeida, M. I. (2017). miR-195 inhibits macrophages pro-inflammatory profile and impacts the crosstalk with smooth muscle cells. *PLOS ONE*, *12*(11), e0188530. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0188530>
- Cardona, P., & Cardona, P. J. (2019). Regulatory T Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2139. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02139/BIBTEX>
- Chadalawada, S., Kathirvel, K., Lalitha, P., Rathinam, S. R., & Devarajan, B. (2022). Dysregulated expression of microRNAs in aqueous humor from intraocular tuberculosis patients. *Molecular Biology Reports*, *49*(1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06846-4/FIGURES/3>
- Cho, H. J., Lim, Y. J., Kim, J., Koh, W. J., Song, C. H., & Kang, M. W. (2020). Different macrophage polarization between drug-susceptible and multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, *20*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12879-020-4802-9/FIGURES/5>
- Cui, J., Li, Z., Cui, K., Gao, Y., Zhang, B., Niu, J., & Wang, Y. (2021). MicroRNA-20a-3p regulates the host immune response to facilitate the mycobacterium tuberculosis infection by targeting IKK β /NF- κ B pathway. *International*

- Immunopharmacology*, 91. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2020.107286>
- Dye, C., Espinal, M. A., Watt, C. J., Mbiaga, C., & Williams, B. G. (2002). Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(8), 1197–1202. <https://doi.org/10.1086/339818>
- Fu, Y., Yang, X., Chen, H., & Lu, Y. (2020). Diagnostic value of miR-145 and its regulatory role in macrophage immune response in tuberculosis. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0238>
- Furci, L., Schena, E., Miotto, P., & Cirillo, D. M. (2013). Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*, 2(3), 128–134. <https://doi.org/10.1016/J.IJMYCO.2013.04.006>
- H, V., K, E., A, B., M, S., JJ, L., & JO, L. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/NCB1596>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU6977/ASSET/0D942D3E-7BB0-410E-B762-FEC151E57E74/ASSETS/GRAPHIC/367_AAU6977_FA.JPEG
- Manna, I., de Benedittis, S., Quattrone, A., Maisano, D., Iaccino, E., & Quattrone, A. (2020). Exosomal miARN as Potential Diagnostic Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals 2020*, Vol. 13, Page 243, 13(9), 243. <https://doi.org/10.3390/PH13090243>
- OMS. (2021). *Tuberculosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- PA, S., D, H., VA, L., EE, S., SH, V., RS, K., AT, W., & GH, F. (1989). A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 320(9), 545–550. <https://doi.org/10.1056/NEJM198903023200901>
- Ramtahal, R., Khan, C., Maharaj-Khan, K., Nallamotheu, S., Hinds, A., Dhanoo, A., Yeh, H. C., Hill-Briggs, F., & Lazo, M. (2015). Prevalence of self-reported sleep duration and sleep habits in type 2 diabetes patients in South Trinidad.

- Journal of Epidemiology and Global Health*, 5(Suppl 1), S35.
<https://doi.org/10.1016/J.JEGH.2015.05.003>
- Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D., & Bisson, G. P. (2018a). Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *European Respiratory Review : An Official Journal of the European Respiratory Society*, 27(147). <https://doi.org/10.1183/16000617.0077-2017>
- Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D., & Bisson, G. P. (2018b). Tuberculosis and lung damage: From epidemiology to pathophysiology. In *European Respiratory Review* (Vol. 27, Issue 147). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/16000617.0077-2017>
- Sinigaglia, A., Peta, E., Riccetti, S., Venkateswaran, S., Manganelli, R., & Barzon, L. (2020). Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers. *Cells 2020, Vol. 9, Page 2160*, 9(10), 2160. <https://doi.org/10.3390/CELLS9102160>
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., Medina, P. De, Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins [S]. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/JLR.M003657>
- Torres-Gonzalez, P., Cervera-Hernandez, M. E., Martinez-Gamboa, A., Garcia-Garcia, L., Cruz-Hervert, L. P., Bobadilla-del Valle, M., Ponce-de Leon, A., & Sifuentes-Osornio, J. (2016). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: A retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre, 2000-2015. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-016-2001-5>
- Wallis, R. S., Pai, M., Menzies, D., Doherty, T. M., Walzl, G., Perkins, M. D., & Zumla, A. (2010). Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *The Lancet*, 375(9729), 1920–1937. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60359-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60359-5)
- Wood, A. J. J., & Iseman, M. D. (2010). Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199309093291108](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199309093291108), 329(11),

784–791. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309093291108>

Ángel Córdova Villalobos, M. H. Á., José Maki, E. O. D., & Ramírez, L.-G. (2009). *Guía para la Atención de Personas con Tuberculosis Resistente a Fármacos* Secretaría de Salud.

Arcos, M., Spinal, A. E., Dalbert, A., Aszlo, L., Adila, F., Oulahbal, B., Ang, S., Ae, J., Im, K., Eniero, N. R., Ven, S., Offner, H., Ieder, A. L. R., Hristopher, C., Ye, D., Ario, M., & Aviglione, C. R. (2009). Global Trends in Resistance to Antituberculosis Drugs.

Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM200104263441706, 344(17), 1294–1303.

<https://doi.org/10.1056/NEJM200104263441706>

Athman, J. J., Wang, Y., McDonald, D. J., Boom, W. H., Harding, C. V., & Wearsch, P. A.

(2015). Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of Mycobacterium tuberculosis Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages . *The Journal of Immunology*, 195(3), 1044–1053. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1402894>

Ayyappan, J. P., Ganapathi, U., Lizardo, K., Vinnard, C., Subbian, S., Perlin, D., &

Nagajyothi, J. F. (2019). Adipose Tissue Regulates Pulmonary Pathology during TB Infection. *MBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02771-18>

Baghaei, P., Marjani, M., Javanmard, P., Tabarsi, P., & Masjedi, M. R. (2013). Diabetes

mellitus and tuberculosis facts and controversies. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-58>

Baker, M. A., Harries, A. D., Jeon, C. Y., Hart, J. E., Kapur, A., Lönnroth, K., Ottmani, S.-

E., Goonesekera, S. D., & Murray, M. B. (2011). The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review. *BMC Medicine* 2011 9:1, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-81>

Bermejo, M. C., Clavera, I., Rosa, M. de la R., J., F., & Marín, B. (2007). *Epidemiología de*

la tuberculosis. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(Supl. 2), 07-19.

<https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1137->

[66272007000400002&script=sci_arttext&tlng=pt](https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1137-66272007000400002&script=sci_arttext&tlng=pt)

C, T., L, Z., & S, A. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature*

Reviews. Immunology, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/NRI855>

Cacho Carranza, Y. (2015). *Epidemiología de la tuberculosis en México*. Agencia

Informativa Conacyt. <http://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/salud/1103->

- Caminero Luna, J. (2003). La Tuberculosis para Médicos Especialistas. *Unión Internacional Contra La Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICtER) 68 Boulevard Saint Michel, 75006 Paris – Francia.*
- Carranza, C., Herrera, M. T., Guzmán-Beltrán, S., Salgado-Cantú, M. G., Salido-Guadarrama, I., Santiago, E., Chávez-Galán, L., Gutiérrez-González, L. H., & González, Y. (2021). A Dual Marker for Monitoring MDR-TB Treatment: Host-Derived miARNs and M. tuberculosis-Derived RNA Sequences in Serum. *Frontiers in Immunology, 12*, 4615. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.760468/BIBTEX>
- CENAPRECE. (2014). *Datos y Retos en Tuberculosis Fármacorresistente en México.*
- Chackerian, A. A., Alt, J. M., Perera, T. V., Dascher, C. C., & Behar, S. M. (2002). Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and Immunity, 70*(8), 4501–4509. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4501-4509.2002/ASSET/4D4573C9-8D87-4861-9A79-5D7BA353D6D6/ASSETS/GRAPHIC/II0820116007.JPEG>
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S. C., Mato, J. M., & Falcon-Perez, J. M. (2008). Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes. *Journal of Proteome Research, 7*(12), 5157–5166. <https://doi.org/10.1021/PR8004887>
- Dooley, K. E., & Chaisson, R. E. (2009). Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *The Lancet Infectious Diseases, 9*(12), 737. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70282-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70282-8)
- DP, B. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell, 116*(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Dye, C., Espinal, M. A., Watt, C. J., Mbiaga, C., & Williams, B. G. (2002). Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases, 185*(8), 1197–1202. <https://doi.org/10.1086/339818>
- EM, O., & BM, O. (2018). The Rise of Noncommunicable Diseases in Kenya: An Examination of the Time Trends and Contribution of the Changes in Diet and Physical Inactivity. *Journal of Epidemiology and Global Health, 8*(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.2991/J.JEGH.2017.11.004>

- F, Y., JA, C., LK, J., & NC, U. (2009). A review of co-morbidity between infectious and chronic disease in Sub Saharan Africa: TB and diabetes mellitus, HIV and metabolic syndrome, and the impact of globalization. *Globalization and Health*, 5.
<https://doi.org/10.1186/1744-8603-5-9>
- FDA. (2011). *El Consorcio de Biomarcadores*.
<https://web.archive.org/web/20120111121650/http://www.biomarkersconsortium.org/>
- FID. (2015). Atlas de la DIABETES de la FID. *International Diabetes Federation*.
- Gillespie, S. H., Gosling, R. D., Uiso, L., Sam, N. E., Kanduma, E. G., & McHugh, T. D. (2005). Early bactericidal activity of a moxifloxacin and isoniazid combination in smear-positive pulmonary tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1169–1171. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKI376>
- Glaziou, P., Falzon, D., Floyd, K., & Raviglione, M. (2013). Global epidemiology of tuberculosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(1), 3–16.
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1333467>
- Goletti, D., Petruccioli, E., Joosten, S. A., & Ottenhoff, T. H. M. (2016). Tuberculosis Biomarkers: From Diagnosis to Protection. *Infectious Disease Reports*, 8(2), 24–32.
<https://doi.org/10.4081/IDR.2016.6568>
- H, V., K, E., A, B., M, S., JJ, L., & JO, L. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/NCB1596>
- Hu, X., Liao, S., Bai, H., Wu, L., Wang, M., Wu, Q., Zhou, J., Jiao, L., Chen, X., Zhou, Y., Lu, X., Ying, B., Zhang, Z., & Li, W. (2019). Integrating exosomal microRNAs and electronic health data improved tuberculosis diagnosis. *EBioMedicine*, 40, 564–573.
<https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.01.023>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.286>
- INEGI. (2018). *Prevalencia de Obesidad, Hipertensión y Diabetes para los Municipios de México 2018*.
- INSP. (2017). *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx*.
<https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de->

vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750

- J, Z., S, L., L, L., M, L., C, G., J, Y., & S, M. (2015). Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2015.02.001>
- JC, C., MJ, P., C, M., & ST, C. (2002). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 10), 2967–2973. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-2967>
- Jeon, C. Y., & Murray, M. B. (2008). Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. *PLoS Medicine*, 5(7), 1091–1101. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0050152>
- JS, S., Y, C., PP, S., & VL, S. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201439363>
- JW, A., QL, R., QH, L., & WH, Z. (2016). Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging Microbes & Infections*, 5(2), e10. <https://doi.org/10.1038/EMI.2016.10>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU6977/ASSET/0D942D3E-7BB0-410E-B762-FEC151E57E74/ASSETS/GRAPHIC/367_AAU6977_FA.JPEG
- Khan, M. A. B., Hashim, M. J., King, J. K., Govender, R. D., Mustafa, H., & Kaabi, J. Al. (2020). Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 10(1), 107. <https://doi.org/10.2991/JEGH.K.191028.001>
- Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X.-M., Xu, Y.-M., Huang, L.-F., & Wang, X.-Z. (2015). Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/657086>
- M, S., & G, R. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 575–581. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.03.007>
- MacFarlane, L., & Genomics, P. M.-. (2010). MicroRNA: biogenesis, function and role in

- cancer. *Ingentaconnect.Com*.
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cg/2010/00000011/00000007/art00006>
- Manna, I., de Benedittis, S., Quattrone, A., Maisano, D., Iaccino, E., & Quattrone, A. (2020). Exosomal miARNmiARN as Potential Diagnostic Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals 2020, Vol. 13, Page 243, 13(9)*, 243.
<https://doi.org/10.3390/PH13090243>
- Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., & Simpson, R. J. (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research, 40(D1)*, D1241–D1244. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR828>
- ML, G.-G., A, P. de L., ME, J.-C., A, J.-C., M, P.-M., S, B.-C., L, F.-R., L, J.-S., J, S.-O., H, O.-D., JL, V.-G., & PM, S. (2000). Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Archives of Internal Medicine, 160(5)*, 630–636. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.160.5.630>
- Muñoz-Torrico, M., Caminero-Luna, J., Migliori, G. B., D'Ambrosio, L., Carrillo-Alduenda, J. L., Villareal-Velarde, H., Torres-Cruz, A., Flores-Vergara, H., Martínez-Mendoza, D., García-Sancho, C., Centis, R., Salazar-Lezama, M. Á., & Pérez-Padilla, R. (2017). Diabetes is Associated With Severe Adverse Events in Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología (English Edition), 53(5)*, 245–250.
<https://doi.org/10.1016/J.ARBR.2016.10.003>
- NA, K.-G., LM, W., LH, C., WO, W., P, N., JS, S., JL, D., & KM, D. (2014). Detection of Mycobacterium tuberculosis peptides in the exosomes of patients with active and latent M. tuberculosis infection using MRM-MS. *PLoS One, 9(7)*.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0103811>
- Nagar, V., Gour, D., Pal, D. K., Singh, A. R., Joshi, A., & Dave, L. (2018). A study on prevalence of diabetes and associated risk factors among diagnosed tuberculosis patients registered under Revised National Tuberculosis Control Programme in Bhopal District. *Journal of Family Medicine and Primary Care, 7(1)*, 130.
https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_289_17
- Natarajan, K., Kundu, M., Sharma, P., & Basu, J. (2011). Innate immune responses to M. tuberculosis infection. *Tuberculosis, 91(5)*, 427–431.
<https://doi.org/10.1016/J.TUBE.2011.04.003>

- Nathella, P. K., & Babu, S. (2017). Influence of diabetes mellitus on immunity to human tubercle bacillus. *Immunology*, 152(1), 13.
<https://doi.org/10.1111/IMM.12762>
- Nour-Neamatollahi, A., Siadat, S. D., Yari, S., Tasbiti, A. H., Ebrahimzadeh, N., Vaziri, F., Fateh, A., Ghazanfari, M., Abdolrahimi, F., Pourazar, S., & Bahrmand, A. (2018). A new diagnostic tool for rapid and accurate detection of Mycobacterium tuberculosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 418–425.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2016.01.026>
- Nourzad, S., Jenkins, H. E., Milstein, M., & Mitnick, C. D. (2017). Estimating the global burden of multidrug-resistant tuberculosis among prevalent cases of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 21(1).
<https://doi.org/10.5588/IJTL.16.0110>
- OMS. (2017). *Organización Mundial de la Salud. Informe mundial de tuberculosis ...* - Google Scholar.
<https://scholar.google.com/scholar?hl=en&q=World+Health+Organization.+Global+Tuberculosis+Report.+Geneva%2C+World+Health+Organization%2C+2017.>
- OMS. (2020a). *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2020*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- OMS. (2020b). *Tuberculosis*. 14/OCT/2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- OMS. (2021a). *Diabetes*. Organización Mundial de La Salud.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- OMS. (2021b). *Tuberculosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- P, M., G, M., IC, V., L, N., G, S., R, B., A, A., LR, C., D, G., A, M., EN, N., F, A., N, H., K, R., & DM, C. (2013). miARN signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *Plos One*, 8(11), e80149–e80149.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080149>
- PA, S., D, H., VA, L., EE, S., SH, V., RS, K., AT, W., & GH, F. (1989). A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human

- immunodeficiency virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 320(9), 545–550. <https://doi.org/10.1056/NEJM198903023200901>
- Peloquin, C. A., Hadad, D. J., Molino, L. P. D., Palaci, M., Boom, W. H., Dietze, R., & Johnson, J. L. (2008). Population pharmacokinetics of levofloxacin, gatifloxacin, and moxifloxacin in adults with pulmonary tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 852–857. <https://doi.org/10.1128/AAC.01036-07>
- Pontali, E., Visca, D., Centis, R., D'Ambrosio, L., Spanevello, A., & Migliori, G. B. (2018). Multi and extensively drug-resistant pulmonary tuberculosis: Advances in diagnosis and management. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 24(3), 244–252. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000477>
- Ramtahal, R., Khan, C., Maharaj-Khan, K., Nallamotheu, S., Hinds, A., Dhanoo, A., Yeh, H. C., Hill-Briggs, F., & Lazo, M. (2015). Prevalence of self-reported sleep duration and sleep habits in type 2 diabetes patients in South Trinidad. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 5(Suppl 1), S35. <https://doi.org/10.1016/J.JEGH.2015.05.003>
- Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D., & Bisson, G. P. (2018a). Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *European Respiratory Review : An Official Journal of the European Respiratory Society*, 27(147). <https://doi.org/10.1183/16000617.0077-2017>
- Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D., & Bisson, G. P. (2018b). Tuberculosis and lung damage: From epidemiology to pathophysiology. In *European Respiratory Review* (Vol. 27, Issue 147). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/16000617.0077-2017>
- Razanamparany, V. R., Ménard, D., Aurégan, G., Gicquel, B., & Chanteau, S. (2002). Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in Antananarivo (Madagascar): High clustering rate in female patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 3964–3969. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.3964-3969.2002>
- Rojas-Valles, E. U., Yureri Sánchez-Godínez, J., Ixchel Bautista-González, A., Garduño-Torres, A. E., & González, Y. (2021). Neumología y Cirugía de Tórax Biomarcadores exosomales: nuevas perspectivas para el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades respiratorias Exosomal biomarkers: new perspectives for the diagnosis and prognosis of respiratory diseases. *Neumol Cir Torax*, 80(4), 2021.

<https://doi.org/10.35366/103452>

Russell, D. G. (2001). Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:8, 2(8), 569–578.

<https://doi.org/10.1038/35085034>

Saldaña, N. G., Zínsen, A., & Valente, J. (2004). *Infectología clínica pediátrica*.

[http://www.sidalc.net/cgi-](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=030795)

[bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=030795](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=030795)

Sectorial De Salud, P. (2018). *Programa de Acción Específico Prevención y Control de la Tuberculosis 2013-2018*.

Seung, K. J., Keshavjee, S., & Rich, M. L. (2015). Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A017863>

Seung, K. J., Omatayo, D. B., Keshavjee, S., Furin, J. J., Farmer, P. E., & Satti, H. (2009). Early outcomes of MDR-TB treatment in a high HIV-prevalence setting in southern Africa. *PLoS ONE*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007186>

Simmons, J. D., Stein, C. M., Seshadri, C., Campo, M., Alter, G., Fortune, S., Schurr, E., Wallis, R. S., Churchyard, G., Mayanja-Kizza, H., Boom, W. H., & Hawn, T. R. (2018). Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. *Nature Reviews Immunology* 2018 18:9, 18(9), 575–589. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0025-3>

Singh, Prachi P., LeMaire, C., Tan, J. C., Zeng, E., & Schorey, J. S. (2011). Exosomes released from M. tuberculosis infected cells can suppress IFN- γ mediated activation of naïve macrophages. *PloS One*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0018564>

Singh, Prachi Pratap, Li, L., & Schorey, J. S. (2015). Exosomal RNA from Mycobacterium tuberculosis-Infected Cells Is Functional in Recipient Macrophages. *Traffic*, 16(6), 555–571. <https://doi.org/10.1111/TRA.12278>

Sinigaglia, A., Peta, E., Riccetti, S., Venkateswaran, S., Manganelli, R., & Barzon, L. (2020). Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 2160, 9(10), 2160.

<https://doi.org/10.3390/CELLS9102160>

- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463. <https://doi.org/10.1097/COH.0B013E32833ED177>
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., Medina, P. De, Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins [S]. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/JLR.M003657>
- Sunnetcioglu, A., Sunnetcioglu, M., Binici, I., Baran, A. I., Karahocagil, M. K., & Saydan, M. R. (2015). Comparative analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis of 411 cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0092-2>
- Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2008.04.033>
- Tegegne, B. S., Mengesha, M. M., Teferra, A. A., Awoke, M. A., & Habtewold, T. D. (2018). Association between diabetes mellitus and multi-drug-resistant tuberculosis: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13643-018-0828-0>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2009 9:8, 9(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Torres-Gonzalez, P., Cervera-Hernandez, M. E., Martinez-Gamboa, A., Garcia-Garcia, L., Cruz-Hervert, L. P., Bobadilla-del Valle, M., Ponce-de Leon, A., & Sifuentes-Osornio, J. (2016). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: A retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre, 2000–2015. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-016-2001-5>
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231–1243. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.06.013>

- Wallis, R. S., Pai, M., Menzies, D., Doherty, T. M., Walzl, G., Perkins, M. D., & Zumla, A. (2010). Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *The Lancet*, 375(9729), 1920–1937. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60359-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60359-5)
- WHO. (2017). *TREATMENT OF TUBERCULOSIS Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care*.
- Wood, A. J. J., & Iseman, M. D. (2010). Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199309093291108*, 329(11), 784–791. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309093291108>

14 Anexos

Se publicó un artículo de revisión en la revista de Neumología y Cirugía de Torax, INER.(Rojas-Valles et al., 2021) Referencia:

Rojas-Valles, E. U., Yureri Sánchez-Godínez, J., Ixchel Bautista-González, A., Garduño-Torres, A. E., & González, Y. (2021). Neumología y Cirugía de Tórax Biomarcadores exosomales: nuevas perspectivas para el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades respiratorias Exosomal biomarkers: new perspectives for the diagnosis and prognosis of respiratory diseases. *Neumol Cir Torax*, 80(4), 2021.

14.1 Metodología detallada.

Para el aislamiento se contó con un volumen de 300µl de cada tiempo (antes de tratamiento, a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento) y utilizando un polímero patentado que precipita suavemente los exosomas por centrifugación, el kit que se utilizó fue el kit de extracción EXOQuick (EXOxxx-1, SBI) siguiendo los pasos correspondientes:

Materiales.

Solución de ExoQuick
Buffer de lisis
Buffer de lavado
Buffer de elusión
Columna de ExoQuick

Se recogió el biofluido y centrifugó a 3000xg durante 15 minutos para eliminar los restos celulares

1. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
2. Se agregó el volumen apropiado de ExoQuick al biofluido clarificado como se muestra en la tabla.

Volumen de suero	Volumen de ExoQuick	Tiempo de incubación
300µl	72µl	30min a 4°C

3. Se mezcló bien invirtiendo o moviendo el tubo y se incubó en hielo durante 30 minutos para el suero. No fue necesario rotar los tubos durante el período de incubación.
4. Se centrifugó la mezcla de ExoQuick / biofluido a 1500 xg durante 30 minutos. La centrifugación se puede realizar en temperatura ambiente o 4°C con resultados similares. Después de la centrifugación, los exosomas pueden aparecer como un gránulo de color beige o blanco en la parte inferior del tubo.
5. Se extrajo con cuidado el sobrenadante y se centrifugó cualquier solución ExoQuick residual mediante centrifugación a 1500 xg durante 5 minutos. Se eliminó todos los rastros de líquido por succión, teniendo mucho cuidado de no alterar los EVs precipitados en el pellet.
6. Se suspendió el sedimento de exosomas en 350 µl de Buffer de lisis y se agitó en el vórtex durante 15 segundos.
7. Por último, se colocó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la lisis completa.

14.2 Extracción de mRNA exosomal a partir de muestras aisladas de exosomas de suero.

A partir de exosomas aislados del suero, se hizo una extracción de los mRNA por la tecnología de separación magnética con perlas magnéticas MagMAX, lo que permitió la recuperación reproducible de ARN de alta calidad incluido miARN que fue adecuado para la amplificación de los miARN por qRT-PCR. El kit que se utilizó para este paso es MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit Thermo Fishers.

Para realizar el aislamiento de RNA a partir de exosomas aislados de suero de pacientes con TB-MDR se necesitaron los siguientes materiales:

A partir de exosomas aislados del suero, se hizo una extracción de los mRNA por la tecnología de separación magnética con perlas magnéticas MagMAX, lo que

permitió la recuperación reproducible de ARN de alta calidad incluido miARN que fue adecuado para la amplificación de los miARN por qRT-PCR. El kit que se utilizó para este paso es MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit Thermo Fishers.

Para realizar el aislamiento de RNA a partir de exosomas aislados de suero de pacientes con TB-MDR se necesitaron los siguientes materiales:

Materiales

Contenido	Temperatura
Caja 1 de 2	
Proteinase K, 50 mg/MI	-20°C
Lysis/Binding Echanger	
TURBO DNase 20U/μL	
Caja 2 de 2	
Lysis Buffer	15°C- 30°C (Temperatura ambiente)
PK Digestion Buffer	
RNA Binding Beads	
Wash Solution 1	
Wash Solution 2	
Ribindin Buffer	
MagMax TURBO DNase Buffer	
Elution Buffer	
Tubos de procesamiento (1.7MI)	
Rack Magnético	

● Procedimiento

Se prepararon las siguientes soluciones de lavado tal y como lo dice el proveedor:

- Se añadió 10 mL de isopropanol a la **Solución de lavado 1 concentrado** se mezcló y almacenó a temperatura ambiente.
- Se añadió 48mL de etanol a la **Solución de lavado 2 concentrado**, se mezcló y almacenó a temperatura ambiente.
- Se precalentó a 65°C el Buffer de elución

- Se preparó la solución de TURBO DNase como se indica en la siguiente tabla, se mezcló y almacenó en hielo hasta su uso.

Componentes	1 Rx	12 Rxs
MagMAX™ TURBO DNase™ Buffer	48µL	576 µL
TURBO DNase™	2µL	24 µL
Total TURBO DNase™ Solution	50µL	600µL

Se preparó la solución de **PK Digestion Mix** de acuerdo con la siguiente tabla:

Componentes	1 Rx	12 Rx
Buffer de Digestión PK	45 µL	540 µL
Proteinasa K	5 µL	60 µL
Total de PK Digestion Mix	50 µL	600 µL

*El PK Digestion Mix se preparó momentos antes de ser utilizado para su uso óptimo.

- Se combinó 50 µL de **PK Digestion Mix** con 100 µL de exosomas aislados previamente con ExoQuick y se mezcló durante 5 minutos.
- Se incubó a 65°C por 30 minutos.

Posteriormente, se preparó el **Lysis Binding Mix**, de acuerdo con la siguiente tabla:

Componentes	1 Rx	12 Rxs
Buffer de lisis	99 µL	1188µL
2-Mercaptoethanol	1 µL	12 µL
Total Lysis Biding Mix	100 µL	1200 µL

- Se adicionó 100µL de **Lysis Binding Mix** a cada muestra.
- Se agregó 20 µL de **RNA Binding Beads** a cada muestra. Se tapó y mezcló por 7 minutos
- Se adicionó 270µL de isopropanol y mezclo por 15 minutos.

- Se colocaron los tubos en el rack magnético durante 5 minutos o hasta que la solución se encontrará clara. Al finalizar, se aspiró lentamente el sobrenadante sin tocar las RNA Binding Beads
- Se removió los tubos del rack magnético y se adicionó 150 μ L de **Wash Solution 1** a cada muestra. Se mezcló durante 1 minuto.
- Se colocó nuevamente los tubos en el Rack Magnético durante 1 minuto o hasta que la solución se encontrará clara. Se aspiró el sobrenadante sin tocas las perlas magnéticas.
- Se repitió estos últimos pasos, con 150 μ L de **Wash Solution 2**
- Se mezcló sin tapas durante 5 minutos a velocidad para evaporar el exceso de alcoholes en la muestra y solo queden las perlas mágneticas.
- Se adicionó 50 μ L de **TURBO DNase Solution** a cada muestra y se tapo y mezcló durante 15 minutos.
- Se adicionó 50 μ L de **Rebinding Buffer** y 100 μ L de **isopropanol** a cada muestra.
- Se tapo y mezcló durante 5 minutos.
- Se colocaron los tubos en el rack magnético durante 5 minutos a o hasta que la solución se encontrara clara.
- Cuidadosamente se aspiró y desecho el sobrenadante sin tocas las RNA Binding Beads.
- Se removieron los tubos de muestra del rack magnético se adicionó 150 μ L de la **Wash Solution 2** a cada muestra.
- Se tapó y mezcló durante 30segundos
- Se colocó los tubos en el rack magnético durante 1 minuto a hasta que la solución se encontrará clara.
- Cuidadosamente se aspiró el sobrenadante sin tocas las perlas magnéticas.
- Se repitió los pasos de adición de la **Wash Solution 2**
- Se mezcló sin tapar durante 5 minutos para evaporar el exceso de solución.
- Se adicionó 50 μ L de **Elution Buffer** pre-calentado a cada muestra, se cubrió y mezcló durante 2 minutos.
- Se incubaron los tubos durante 5 minutos a 65°C.

- Se mezcló durante 2 minutos
- Se colocaron los tubos en el rack magnético durante 3 minutos o hasta que la solución este clara.
- Se etiquetaron microtubos de 0.7 mL
- Se transfirió el sobrenadante (50 μ L) a cada tubo.
- Las muestras purificadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

14.3 Perfil de expresión de miARN en exosomas.

Para la amplificación de los miARNs se utilizará el kit síntesis de ADNc de miARN TaqMan™ Advanced donde utiliza la formación de picos con colas de poli-A en el extremo 3' y la ligación en el extremo 5' de una secuencia de un adaptador para extender por cada extremo los miARN maduros presentes en la muestra antes de la transcripción inversa. Los cebadores universales de RT reconocen las secuencias universales presentes en los extremos ampliados 5' y 3' de los miARN maduros. Todos los miARN maduros de la muestra se transcriben inversamente en ADNc y con el fin de mejorar la detección de los objetivos de miARN de baja expresión, el ADNc se amplifica mediante los cebadores miR-Amp universales y la mezcla maestra miR-Amp para aumentar de forma uniforme la cantidad de ADNc en cada objetivo y así, mantener los niveles relativos de expresión diferencial.

Al cuantificar los niveles de expresión de miARN se tomó en cuenta que la variación en la cantidad de material de partida, la recolección de muestras, la preparación, la calidad de los miARNy la eficacia de la transcripción (RT) puede atribuir a los errores de cuantificación. Por eso fue importante la normalización de miARNmiARN de control endógenos ya que es actualmente el método más preciso para corregir los errores mencionados con anterioridad a la hora de cuantificar los miARNs. Un ideal miARNs de control endógeno muerta una expresión génica que es relativamente constante. Los pasos en general para medir el nivel de expresión de los miARN exosomales fue la siguiente.

Materiales

- **TaqMan Advance miARN cDNA Syntesis Kit (Cat. A28007)**
- **TaqMAN Advance miARN Assays**

Procedimiento:

1. Preparación de la muestra

Se tomó la muestra de RNA total previamente aislada y purificada. Se hizo la retrotranscripción y enriquecimiento cada 12 muestras, para disminuir el margen de error, así como en cada bloque se consideró una reacción de mas considerando el error de pipeteo.

2. Reacción de cola de poli (A)

- Se descongelaron las muestras y los reactivos, posteriormente se mantuvieron en hielo, se mezcló en vortex todos los componentes y se le dio un spin para bajar las soluciones de la tapa/pared del tubo, así como se eliminó las burbujas.
- En un tubo de 1.5 mL, se preparó la solución de **Poly (A) Reaction Mix** para 13 reacciones.

Componente	1 Rxn	13 Rxn
10X Poly (A) Buffer	0.5 µL	6.5 µL
ATP	0.5 µL	6.5 µL
Poly (A) Enzyme	0.3 µL	3.9 µL
RNase- Free water	1.7 µL	22.1 µL
Total Poly (A) Reaction Mix Volumen	3.0 µL	39 µL

- Se adicionó 2 µL de muestra a cada tubo de reacción y transferir 3 µL de la **Poly(A) Reaction Mix**. Volumen final: 5 µL
- Se colocaron los tubos en el termociclador y se configuraron las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura	Tiempo
Polyadenylación	37°C	45 minutos
Reacción de paro	65°C	10 minutos
Hold	4°C	Hold

3. Reacción de ligación del Adaptador

En un tubo de 1.5 mL, se preparó la **Ligation Reaction Mix**, de acuerdo con la siguiente tabla:

Componente	1Rxn	13 Rxn
5X DNA Ligase Buffer	3 μ L	39 μ L
50% PEG 8000	4.5 μ L	58.5 μ L
25X Ligation Adaptor	0.6 μ L	7.8 μ L
RNase Ligase	1.5 μ L	19.5 μ L
RNase- Free wáter	0.4 μ L	5.2 μ L
Volumen total de Ligation Reaction Mix	10 μ L	1300 μ L

- Se transfirió 10 μ L de la **Ligation Reaction Mix** a cada tubo que contenga el producto de la reacción de cola de Poly (A). Volumen final:15 μ L.
- Se colocaron los tubos en el termociclador y se incubaron utilizando las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
Ligation	16°C	60 minutos
Hold	4°C	Hold

4. Reacción de transcripción inversa (RT)

- En un tubo de 1.5 mL, se preparó la **RT Reaction Mix** de acuerdo con la siguiente tabla:

Componente	1Rxn	13 Rxn
5X RT Buffer	6 μ L	78 μ L
dNTP Mix (24mM c/u)	1.2 μ L	15.6 μ L
20X Universal RT primer	1.5 μ L	19.5 μ L
10X Enzyme mix	3 μ L	39 μ L
RNase- Free water	3.3 μ L	49.5 μ L
Volumen Total de RT Reaction Mix	15 μ L	195 μ L

- Se transfirió 15 μ L de la **RT Reaction Mix** a cada tubo que contenía el producto de la reacción de ligación de adaptador. Volumen total: 30 μ L
- Se colocaron los tubos en el termociclador e incubaron utilizando las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	42°C	15 minutos
Reacción de paro	85°C	5 minutos
Hold	4°C	Hold

5. Reacción de miR-Amp

En un tubo de 1.5 mL se preparó la **miR-Amp Reaction Mix** de acuerdo con la siguiente tabla:

Componente	1 Rxn	13 Rxn
2X miR-Amp Master Mix	25µL	325µL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5µL	32.5µL
RNase- Free wáter	17.5µL	227.5µL
Volumen total RT Reaction Mix	45µL	585µL

- Se transfirió 45 µL de la **miR-Amp Reaction Mix** a uno tubo nuevo.
- Se adicionó 5 µL del producto de reacción de la RT a cada tubo. Volumen final: 50 µL.
- Se colocaron los tubos en el termociclador y se incubaron utilizando las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	5 minutos	1
Desnaturalizar	95°C	3 segundos	14
Anneal/Extend	60°C	30 segundos	
Reacción de paro	99°C	10 minutos	1
Hold	4°C	Hold	1

- Se almacenó el producto e la reacción miR-Amp sin diluir a 20°C.

14.4 Evaluación de la expresión de miARN endógenos a partir de matriz exploratoria

1. Se reparó una dilución 1:5 de la plantilla de cDNA (el producto de reacción miR-Amp) y posteriormente se hizo un pool de 5 pacientes con TB-MFR
2. Se agitó suavemente la botella de TaqMan® Fast Advanced Master Mix para mezclar los contenidos
3. Se retiró la placa de matriz TaqMan® de su embalaje, centrifugue un poco y luego retire la cubierta de la placa.

Componentes de Reacción:

Componente	Placa Fast
Templado de cDNA diluido (1:5)	264 μ L
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	528 μ L
RNase Free Water	264 μ L
Volumen total de reacción	1056 μ L

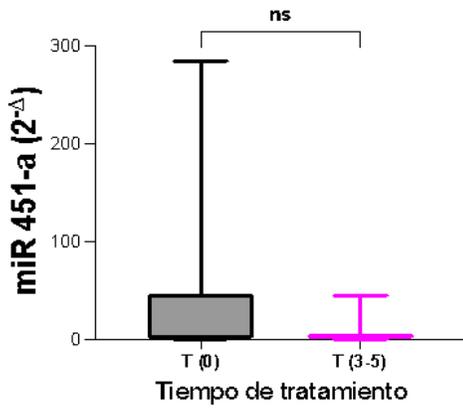
4. Se añadieron los componentes de la reacción a los pocillos de la placa de reacción siguiendo el diseño de muestra que se designa en sus documentos de placa confiados.
 - 10 μ L por pocillo para placas Fast
 - 20 μ L por pocillo para placas estándar
5. Se selló la placa de reacción con una cubierta adhesiva, luego se agitó para mezclar los contenidos.
6. Se programó el Step One Plus, con los parámetros de PCR del fabricante:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	20 segundos	1
Desnaturalización	95°C	3 segundos	40
Templado/ Extendido	65°C	30 segundos	

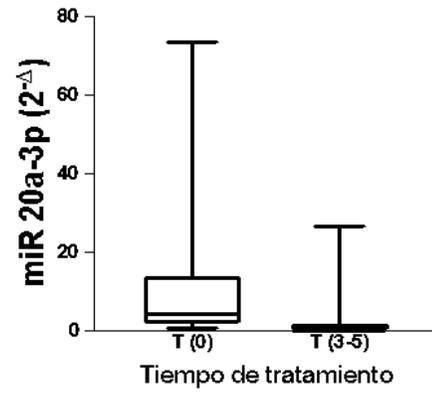
7. Se analizaron los datos obtenidos de la qPCR.

14.5 Datos obtenidos de miARNmiARN expresados de una matriz de exploración de pacientes con TB-MFR

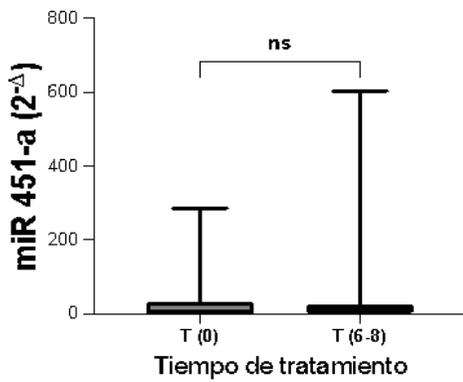
a)



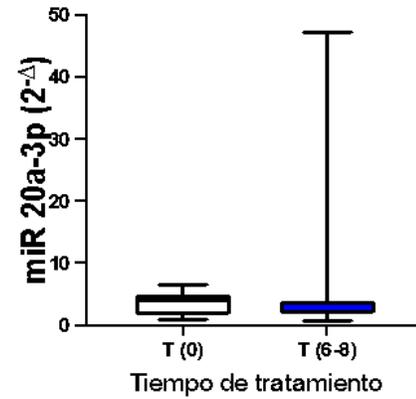
d)



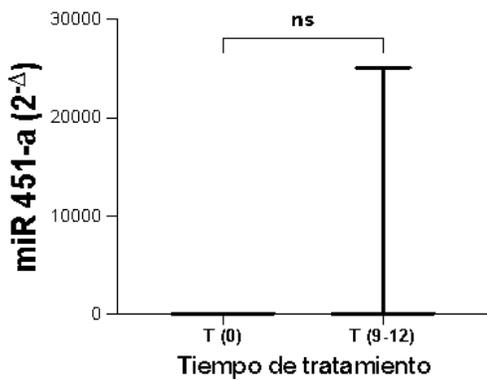
b)



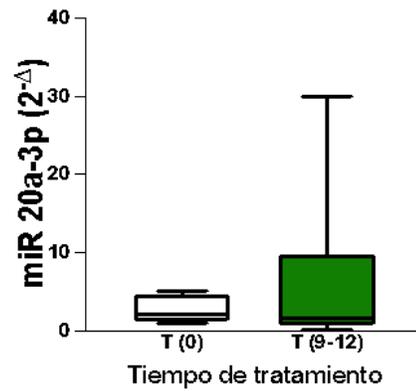
e)



c)



f)



Expresión de miRNA hsa-miR-451^a y miR-20^a-3p

miARN	T0	T12
hsa-miR-20a-3p	29.05567551	Undetermined
hsa-miR-195-5p	31.60767365	Undetermined
hsa-miR-328-3p	32.32848358	Undetermined
hsa-miR-543	33.52133942	Undetermined
hsa-miR-155-5p	36.60807419	Undetermined
hsa-miR-18a-3p	36.9539299	Undetermined
hsa-miR-133b	Undetermined	39.36637115
hsa-miR-409-3p	Undetermined	39.14609909
hsa-miR-133a-3p	Undetermined	39.0778656
hsa-miR-106b-3p	Undetermined	38.74437714
hsa-miR-373-5p	Undetermined	36.82288742
hsa-miR-93-3p	Undetermined	35.20497131
hsa-miR-338-3p	Undetermined	34.54976273
hsa-miR-21-3p	Undetermined	34.49645233
hsa-miR-885-5p	Undetermined	33.82443237
hsa-miR-22-5p	Undetermined	33.36706924
hsa-miR-33a-5p	Undetermined	33.20317841
hsa-let-7c-5p	Undetermined	32.85919189
hsa-miR-590-5p	Undetermined	32.80963135
hsa-miR-363-3p	Undetermined	32.62764359
hsa-miR-132-3p	Undetermined	32.49689865
hsa-miR-199a-5p	Undetermined	31.90057564
hsa-miR-140-5p	Undetermined	31.84666634
hsa-miR-331-3p	Undetermined	31.75607491
hsa-miR-152-3p	Undetermined	31.51879692
hsa-miR-551b-3p	Undetermined	31.47094536
hsa-miR-193b-3p	Undetermined	31.2579689
hsa-miR-144-5p	Undetermined	31.07780266
hsa-miR-29c-3p	Undetermined	31.01079178
hsa-miR-20b-5p	Undetermined	31.00663376
hsa-miR-30e-5p	Undetermined	30.7750473
hsa-miR-142-5p	Undetermined	29.97034836
hsa-let-7d-3p	Undetermined	29.93468475
hsa-miR-324-3p	Undetermined	29.7976265
hsa-miR-106b-5p	Undetermined	29.01012421
hsa-miR-30c-5p	Undetermined	28.90625572
hsa-miR-145-5p	Undetermined	28.73421097
hsa-let-7e-5p	Undetermined	28.68997765
hsa-miR-197-3p	Undetermined	24.18584442
hsa-miR-92a-3p	26.7600708	26.82304192
hsa-miR-223-3p	25.41051483	25.47878075
hsa-miR-27a-3p	29.97758675	29.907938

hsa-miR-320e	28.81337166	28.89036179
hsa-miR-205-5p	27.96895599	28.09300613
hsa-miR-224-5p	32.59539413	32.74313354
hsa-miR-150-5p	27.15849495	27.30678368
hsa-miR-27b-3p	31.96850395	32.11865616
hsa-miR-128-3p	32.40904617	32.24991608
hsa-miR-451a	21.85524368	21.67033005

14.6 Selección final de miARNmiARN diferencialmente expresados en una matriz de exploración en pacientes con TB-MFR

miARN	T0	T12	Detectado en
hsa-miR-20a-3p	29.05567551	Undetermined	T0
hsa-miR-195-5p	31.60767365	Undetermined	T0
hsa-miR-328-3p	32.32848358	Undetermined	T0
hsa-miR-145-5p	Undetermined	28.73421097	T12
hsa-let-7e-5p	Undetermined	28.68997765	T12
hsa-miR-197-3p	Undetermined	24.18584442	T12
hsa-miR-223-3p	25.41051483	25.47878075	AMBOS
hsa-miR-451a	21.85524368	21.67033005	AMBOS