



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Perfil de expresión de 3 miRNAs en los neumocitos
secretores tipo II estimulados con *Pseudomonas
aeruginosa***

T E S I S

Que para obtener el título de:

Biólogo

P R E S E N T A:

Abraham Martin Leyto Gil

Director de tesis:

M. en C. Héctor Flores Herrera



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México a 06 de marzo del 2021.



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer/IER) bajo la dirección del M. en C. Héctor Flores Herrera. El desarrollo de la tesis forma parte del proyecto “Evaluación de la respuesta inmunológica, colagenolítica, y el efecto sobre la adhesión celular de los neumocitos secretores tipo II del epitelio pulmonar después de la infección con *P. aeruginosa* y *U. urealyticum* en condiciones *in vitro*” el cual contó con presupuesto federal con número de registro: 212250-22661 otorgado a HFH.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	7
DEDICATORIAS	7
RESUMEN	8
1.0 INTRODUCCIÓN	10
2.0 ANTECEDENTES	11
2.1 Sistema respiratorio.....	11
2.2 Alveolos.....	12
2.3 Respuesta inmune en el pulmón.....	13
2.4 Surfactante pulmonar en la respuesta inmune.....	14
2.5 Pseudomonas aeruginosa.....	15
2.6 Receptores de tipo Toll (TLR).....	16
2.7 micro RNA (miRNAs).....	19
2.7.2 MiRNA-126 en procesos inflamatorios.....	22
2.7.3 miRNA-146 en procesos inflamatorios.....	24
3.0 JUSTIFICACIÓN	25
4.0 OBJETIVOS E HIPOTESIS	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5.0 HIPÓTESIS	26
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1 Establecimiento de la línea celular.....	27
6.2 Pseudomonas aeruginosa.....	27
6.3 Estimulación de las células A549 con P. aeruginosa.....	28
6.4 Extracción del RNA total.....	28
6.5 Reacción de RT.....	29
6.6 Reacción de PCR.....	29
6.7 Análisis estadístico.....	30
7.0 RESULTADOS	31
7.1 Expresión de miRNAs en las células A549 estimuladas con P. aeruginosa.....	33

7.1.1 miR-21	33
7.1.2 miR-126	35
7.1.2 miR-146	36
8.0 DISCUSIÓN	38
9.0 CONCLUSIÓN	42
10.0 REFERENCIAS.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las vías aéreas.....	11
Figura 2. Estructura del alvéolo..	13
Figura 3. Biogénesis de los miRNAs.	20
Figura 4. Activación de las vías NF-κB.	24
Figura 5. Perfil de expresión del miR-21 después de estimular a las células A549 con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figura 6. Perfil de expresión del miR-126 después de estimular a las células A549 con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	36
Figura 7. Perfil de expresión del miR-146 después de estimular a las células A549 con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores de cada miRNA para la RT	29
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores de cada miRNA de PCR.....	30
Tabla 3. Tipificación morfológica y bioquímica de la cepa de <i>P. aeruginosa</i>	31
Tabla 4. Tabla 4. Sensibilidad a antibióticos por el método de difusión en disco	32

ABREVIACIONES

cDNA	Ácido <u>d</u>esoxirribo<u>n</u>ucleico <u>c</u>omplementario
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
miRNA	microRNA
MUC1	<u>M</u>ucin-1 <u>c</u>ell surface associated
nt	<u>N</u>ucleó<u>t</u>ido
PCR	<u>R</u>eacción en <u>c</u>adena de la <u>p</u>olimerasa
RNA	Ácido <u>r</u>ibo<u>n</u>ucleíco
RT	<u>R</u>etro <u>t</u>rascriptasa
μL	Microlitro
UTR	<u>U</u>n<u>t</u>ranslated <u>R</u>egion (región no traducida)

AGRADECIMIENTOS

Al Doc. Héctor Por tanto apoyo y esta gran oportunidad de trabajar con él.

A Mis padres que siempre me han dado todo para conseguir mis metas.

A mis hermanos por sus palabras y el acompañamiento en los momentos difíciles.

A mis tíos que son mis segundos padres y un gran pilar.

DEDICATORIAS

A mi mamá y mi papá

A Mi tío Faustino y mi tía Male.

A mi tía Erika y mi tío Fer.

A Mis Hermanos, son mi motor.

RESUMEN

Introducción La superficie del epitelio alveolar está compuesta por los neumocitos secretores de tipo I (NSTI) y NSTII. Los NSTII tienen un papel clave en la síntesis y almacenamiento del surfactante pulmonar, y en el establecimiento de mecanismos de defensa innata en el pulmón. *Pseudomonas aeruginosa* expresa una amplia gama de factores de virulencia que inducen la activación de la respuesta inflamatoria comprometiendo la actividad inmunológica y de defensa del huésped. Recientemente se ha demostrado que los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNA no-codificante los cuales constituyen un sistema de regulación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, no se ha demostrado el efecto que induce *P. aeruginosa* sobre la expresión de los miRNAs en los NSTII para lo cual utilizaremos la línea celular A549.

Objetivos Determinar el perfil de expresión de los miRNA-21, -126, y -146 en el medio de cultivo de las células A549 después de la estimulación con *P. aeruginosa*

Material y Métodos La línea celular A549 fue expandida en cajas de cultivo de 12 pozos y se les adicionó 1 mL del medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomicina. Las cajas de cultivo fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Los ensayos se realizaron hasta que se obtuvo una confluencia celular superior al 95%. Las células A549 fueron estimuladas con *P. aeruginosa* (10², 10⁴, 10⁵ y 10⁶ UFC/mL). El medio de cultivo fue recuperado a las 3, 6 y 24 horas. En tubos Eppendorf se colocaron 500 µL del medio de cultivo de cada condición experimental y se le añadió 500 µL del reactivo de Trizol con la finalidad de obtener el RNA total. El RNA total fue cuantificado en el espectrofotómetro mediante la relación A_{260/280}. Con 9 ng del RNA total se realizó la técnica de retrotranscriptasa (RT), y el cDNA obtenido fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final con iniciadores específicos para cada miRNA. Los amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 4% y la banda de expresión fueron visualizadas en luz ultravioleta. La banda de expresión de cada miRNA fue semi cuantificada mediante el programa de ImageJ (NIH, USA). Los datos son mostrados como la media ± desviación estándar y se consideró una diferencia estadísticamente significativa de $p \leq 0.05$.

Resultados A las 3 horas de estimulación con *P. aeruginosa* (10^6 UFC/mL) observamos en el medio de cultivo de las células A549 el aumento significativo de 1.3- ($p \leq 0.001$), 1.2-veces ($p \leq 0.004$) la expresión del miR-21 y miR-146 respectivamente, en relación con el grupo control. A este intervalo de tiempo no encontramos cambios significativos en el miR-126. A las 6 horas de estimulación no encontramos aumentos en la expresión del miR-21, -126 con respecto al grupo control. En tanto que el miR-146 disminuyó significativamente 1.1-veces con respecto al grupo control ($p \leq 0.004$). Finalmente, a las 24 horas observamos un aumento significativo en la expresión del miR-21 ($p \leq 0.001$) en tanto que la expresión del miR-126 no observamos cambios en su expresión. El miR-146 disminuyó su expresión ($p \leq 0.001$) con respecto al grupo control.

Conclusiones Los resultados obtenidos indican que *Pseudomonas aeruginosa* modula diferencialmente la expresión de los miRNAs en las células A549 de manera dosis dependiente y con respecto al tiempo de estimulación.

1.0 INTRODUCCIÓN

Anatómicamente el sistema respiratorio está dividido en 1) la vía aérea superior que está constituida por nariz, faringe y laringe, y 2) la vía aérea inferior que lo conforman la tráquea, bronquios, bronquiolos, conducto alveolar y alvéolos (1)).

Los alvéolos son las principales estructuras terminales de la vía aérea distal para el intercambio de gases y las unidades de función pulmonar. Las superficies de los alvéolos se componen de dos tipos de células epiteliales: Neumocitos secretores tipo I (NSTI) y los de tipo II (NSTII) (2).

Los NSTI son células con forma aplanada y cubren el 95% de la superficie alveolar del pulmón, aunque son menos numerosas que las NSTII. La función principal de las células NSTI es el intercambio de gases y el mantenimiento del equilibrio de iones y fluidos (3). Los NSTII, son células grandes y cuboidales, y cubren un porcentaje mucho menor de superficies alveolares. Son células especializadas para mantener la función pulmonar y la homeostasis. Los NSTII secretan proteínas activas que regulan el metabolismo del surfactante alveolar, además de proteínas asociadas con la respuesta inmunológica innata y proteínas involucradas con la regeneración y restauración alveolar en respuesta a una lesión (4), sintetizan y secretan una variedad de intermediarios antimicrobianos, péptidos y proteínas que pueden eliminar microorganismos directamente o ser utilizados por neutrófilos o macrófagos para facilitar la eliminación bacteriana (5).

Recientemente, se ha demostrado el papel de los microRNA (miRNAs) en la regulación de la respuesta inflamatoria, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (6) y en la expresión en diferentes patologías pulmonares humanas (7, 8); sin embargo, existen pocos datos experimentales que demuestren la expresión diferencial de los miRNA y de las vías proinflamatorias en el tejido respiratorio. En el presente trabajo nos hemos propuesto determinar el perfil de

expresión de tres miRNAs en el medio de cultivo de la línea celular A549 estimuladas con *Pseudomonas aeruginosa* a las 3, 6 y 24 horas.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Sistema respiratorio

Anatómicamente el sistema respiratorio está dividido en 1) la vía aérea superior que está constituida por nariz, faringe y laringe, y 2) la vía aérea inferior que lo conforma tráquea, bronquios, bronquiolos, conducto alveolar y alvéolos (figura 1) (1).

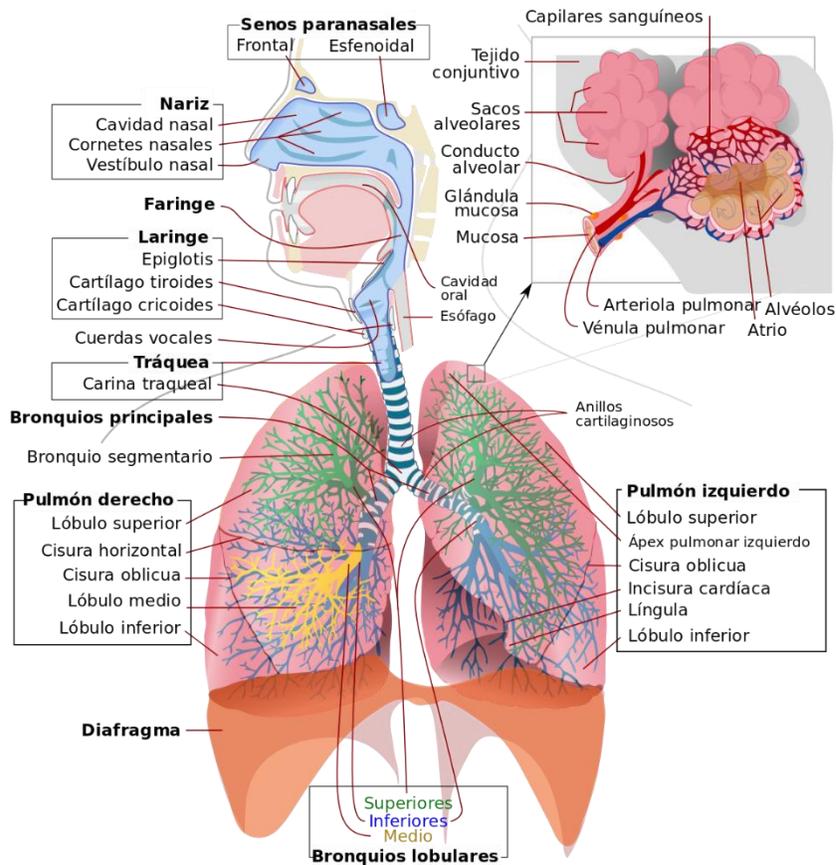


Figura 1. Las vías aéreas. Se muestran la conformación de las vías superiores e inferiores del sistema respiratorio. (Tomada de Principios de anatomía y fisiología, Gerard J Tortora 2013)

La vía aérea superior está revestida con epitelio respiratorio, que se conoce como epitelio columnar, pseudoestratificado, y ciliado. Cuando se respira, el aire pasa

a través de la nariz hacia los conductos nasales que se comunican con los senos paranasales. El aire pasa luego a la nasofaringe, que es la parte más posterior de la cavidad nasal que se comunica con la garganta. Una vez en la faringe, desciende pasando por la orofaringe y hacia la laringofaringe y continúa hacia la tráquea, que se bifurca en los bronquios (izquierdo y derecho) finalizando en la rama de árbol en bronquiolos.

Los bronquiolos se dividen además en bronquiolos respiratorios cada vez de menor tamaño cuyas ramas terminales contienen racimos de conductos alveolares, sacos y alvéolos terminales. Los alvéolos son las principales estructuras terminales de la vía aérea distal para el intercambio de gases y las unidades de función pulmonar.

1.2 Alveolos

Las superficies de los alvéolos se componen de dos tipos de células epiteliales: neumocitos secretores tipo I (NSTI) y NSTII (2). Los NSTI son células con forma aplanada y cubren el 95% de la superficie alveolar del pulmón, aunque son menos numerosas que las células NSTII. La función principal de las células NSTI es el intercambio de gases y el mantenimiento del equilibrio de iones y fluidos (3). Los NSTII, son células grandes y cuboidales, y cubren un porcentaje mucho menor de superficies alveolares. Son células especializadas para mantener la función pulmonar y la homeostasis.

Los NSTII secretan proteínas que regulan tanto la tensión alveolar, la respuesta inmunológica innata (9), así como proteínas involucradas con la regeneración y restauración alveolar en respuesta a una lesión (4, 10)

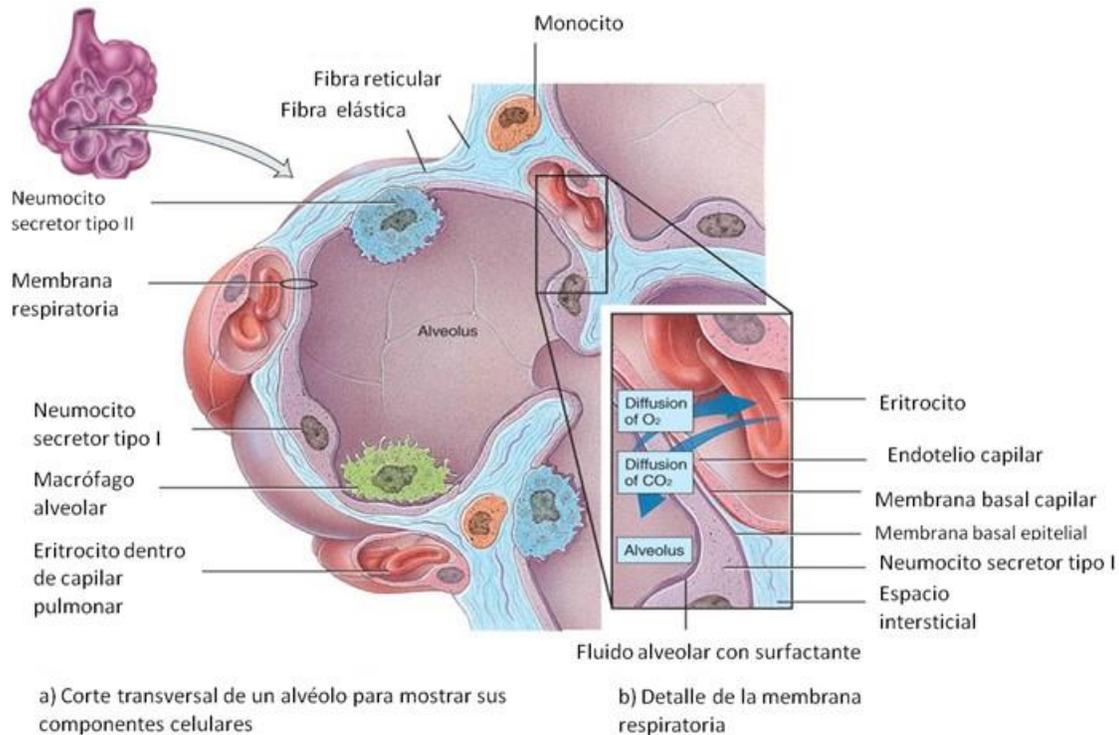


Figura 2. Estructura del alvéolo. Se señala cada uno de los elementos celulares (neumocitos secretores tipo I, II, macrófagos alveolares, y monocitos) y acelulares (fibra reticular y elástica, capilar pulmonar, y espacio intersticial) que componen el alveolo. Imagen tomada de Pacheco, 2007.

2.3 Respuesta inmune en el pulmón

Por su función fisiológica el pulmón está continuamente expuesto a diversas partículas, microorganismos y gases, los cuales potencialmente podrían tener un efecto perjudicial sobre la homeostasis pulmonar y la vulnerabilidad a la infección (11, 12). A pesar de la exposición a posibles toxinas y agentes patógenos durante la respiración, la frecuencia de infección grave y lesión en el tracto inferior es relativamente baja en individuos sanos (13).

La defensa pulmonar consiste estructuralmente en la vía aérea y el epitelio alveolar que reviste la superficie interna del pulmón y actúa como una barrera física contra las partículas y microorganismos que ingresan al tracto respiratorio. En particular, las células del epitelio cilíndrico de la vía aérea utilizan mecanismos

mucociliares para eliminar los patógenos invasores y partículas. El epitelio también tiene un papel auxiliar mediante la elaboración de citocinas inflamatorias (14-16), quimiocinas (17), y factores de crecimiento (18, 19) creando una red de citocinas las cuales activaran a los macrófagos alveolares para eliminar el proceso infeccioso que las activo (5, 20). Los productos bioactivos liberados por las células epiteliales interactúan con el surfactante pulmonar (SP) el cual es un complejo de lípidos y proteínas que recubre la superficie alveolar.

2.4 Surfactante pulmonar en la respuesta inmune

El SP participa tanto en la disminución de la tensión superficial en la interfase aire-líquido, evitando así el colapso alveolar al final de la espiración (21) y como componente integral del sistema inmune innato del pulmón regulando la inflamación y en la prevención de las infecciones microbianas del pulmón distal (22). Los principales constituyentes lipídicos del SP son fosfolípidos [dipalmitoil fosfatidil colina saturada (50%), fosfatidil glicerol (12%), fosfatidil etanolamina (5%), fosfatidil inositol (4%), fosfatidilserina (1.5%), esfingomielina (1%) y lisofosfolípido (<1%)], colesterol, y proteínas (23). La función óptima del surfactante requiere la presencia de cuatro proteínas denominadas SP-A, -B, -C y -D (23).

La SP-A, es la más abundante con aproximadamente el 70%, en tanto que la SP-B comprende el 10% de la composición tensioactiva; sin embargo, la SP-B es la más crítica para el funcionamiento respiratorio, su ausencia o mutaciones da como resultado insuficiencia respiratoria y muerte poco después del nacimiento (24, 25). Entre los componentes tensioactivos, la SP-A y la SP-D han sido asociadas en la defensa inmunológica innata pulmonar (26). Las proteínas SP-A y SP-D son capaces de unir y neutralizar bacterias Gram-negativas y Gram-positivas actuando como opsoninas. A menudo, estas proteínas inducen la agregación bacteriana que sirve como un contexto físico apropiado para la

fagocitosis (27). Estas proteínas surfactantes interactúan con *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (específicamente las cepas rugosas), *Salmonella minnesota*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo B, *Haemophilus influenza* y *Staphylococcus aureus* (28). Tanto la SP-A como la SP-D se unen al componente estructural del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas, a través de diferentes dominios (27). Después de unirse a las bacterias, SP-A y SP-D facilitan su eliminación a través de numerosos mecanismos, o bien actuando como opsoninas para mejorar la eliminación bacteriana fagocítica (29).

Además, parecen exhibir efectos antimicrobianos sobre las bacterias al aumentar potencialmente la permeabilidad de sus membranas (30). Se ha demostrado que de los mecanismos de evasión de *P. aeruginosa* está mediado a través del reconocimiento de la SP-D ya que esta proteína no es capaz de agregar eficazmente a *P. aeruginosa* (31) en tanto que la SP-A parece no interactuar directamente con este agente patógeno (32). Estas proteínas promueven la fagocitosis indirectamente, al estimular la actividad de los macrófagos alveolares (29).

2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo que crece a 37°C; sus colonias en gelosa sangre son planas, color grisáceo, β-hemolíticas y con un olor característico a tortilla. *P. aeruginosa* pertenece al gran grupo de bacilos no fermentadores por esta razón no son capaces de fermentar azúcares como los contenidos en el tubo de agar hierro (KIA; Kligler). Las bacterias son móviles por medio de un flagelo polar y producen pigmentos de manera natural como la piocianina que es color azul y la fluoresceína, que se observa de color amarillo en placa de agar tripton-soja (TSA) y que al hacer incidir luz ultravioleta (UV) sobre el cultivo, emite fluorescencia.

P. aeruginosa emplea diferentes factores de virulencia para interactuar y atravesar monocapas de células epiteliales (18, 33). Estos incluyen un flagelo simple polar el cual facilita el desplazamiento; el pili retráctil tipo 4, que provee adhesión y movimiento; y un sistema de secreción tipo 3 (T3SS), que inyecta un conjunto de proteínas bacterianas "efectoras" en las células huésped (34, 35).

P. aeruginosa pertenece a la familia *pseudomonaceae* que incluye 12 especies (36), es una bacteria aeróbica Gram-negativa que mide de 0.5 a 0.8 μm por 1.5 a 3.0 μm . Además, segrega diferentes pigmentos como piocianina (azul-verde), fluoresceína (amarillo-verde y fluorescente) y piorubina (rojo-marrón). Preliminarmente se puede identificar por su olor específico *in vitro* y por el color azul-verdoso de las colonias productoras de fluorescencia. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C; la temperatura máxima del crecimiento es 42 °C. Usualmente, las cepas son móviles por medio de un único flagelo polar. El tamaño del genoma de *P. aeruginosa* varía desde alrededor de 5.2 a 6.3 Mb (37, 38). Rara vez es un miembro de la flora microbiana normal en humanos.

Las tasas de colonización representativas para sitios específicos en humanos como en el caso de la piel es menor al 2%, mucosa nasal menos del 3,3%, garganta menos del 6,6% y en muestras fecales es entre el 2,6 al 24% (39); sin embargo, las tasas de colonización pueden exceder el 50% (40), especialmente entre pacientes que han experimentado un trauma o una brecha en las barreras cutáneas o mucosas por ventilación mecánica, traqueotomía, catéteres, cirugía o quemaduras graves (41, 42). Diversas evidencias han demostrado que la interacción de *P. aeruginosa* con el epitelio alveolar esta mediado por los receptores de tipo TLRs (Toll-like receptor) (Man He 2016, PMID 27270888)

2.6 Receptores de tipo TLRs

Los receptores de tipo TLRs juegan un importante papel en la regulación del sistema inmunológico al reconocer diferentes moléculas asociadas a patógenos

(CITAs). En mamíferos se han detectado 10 tipos (TLR1-TLR10) (43). Schulz y colaboradores (44) localizaron en el epitelio celular a los TLR1-9, y su localización ha sido detectada en diversos tipos celulares (45, 46), y en vesículas celulares (47, 48), retículo endoplasmático, endosomas (49, 50), y lisosomas (47).

El lipopolisacárido (LPS) de *P. aeruginosa* activa principalmente al TLR-4 en las cadenas laterales del lípido tipo A están produciendo su hiper acilación, como ha sido observado en aislamientos de pacientes con fibrosis quística con infección crónica (51). Otro de los receptores de tipo TLR que participa en el reconocimiento de *P. aeruginosa* es el TLR-5 el cual es activado por la flagelina. Esta unión, amplifica su respuesta al unirse con el receptor que reconocen patrones moleculares específicos asociados a patógenos (PAMP) que ocurren una vez que las bacterias acceden a la superficie basolateral del epitelio donde se expresa el receptor. El ADN bacteriano comprende regiones denominadas islas de citocinas y guaninas (CpG) no metiladas y son estimulas por el TLR-9 (52) y probablemente contribuye a la detección de bacterias *P. aeruginosa* y biopelículas que contienen ADN extracelular, ya que los ratones TLR9^{-/-} pueden resistir el desafío letal con *P. aeruginosa* (53).

La respuesta inmune innata, esta mediada tanto por las células epiteliales como por las células profesionales (dendríticas y macrófagos), conformando la línea de defensa frente a infecciones. En la superficie celular, esta respuesta esta mediada por la activación de los miembros de la superfamilia receptor Toll/interleucina-1 (TIR), los cuales se subdividen en dos grupos: receptores de Interleucina-1 (IL-1R) y los TLR. La familia IL-1R contiene 10 receptores que median la respuesta a IL-1a, IL-1β e IL-8, mientras que la familia TLR contiene 11 miembros que están involucrados con el reconocimiento de patrones moleculares conservados de microorganismos denominados PAMPs (54). Todos los miembros de esta superfamilia de receptores contienen el dominio citoplasmático TIR y este dominio median la señalización a través de una vía intracelular similar. Por lo tanto, la señalización a través del dominio TIR implica

una asociación con la proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación de mieloides 88 (MyD88) la cual recluta la quinasa 1 asociada a IL-1R (IRAK1) y el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) después de la unión del ligando. La disociación de IRAK1 de MyD88 después de la fosforilación provoca la activación de TRAF6, que posteriormente estimula la formación y activación del complejo TAK1/TAB1/TAB2/TAB3. Esto a su vez activa una variedad de factores de transcripción proinflamatorios, como el factor nuclear (NF)- κ B el cual en condiciones basales se encuentra en el citoplasma unido al inhibidor- κ B α (I- κ B α). La degradación de I- κ B α seguida de la fosforilación por Inhibidor- κ B quinasa-2 (IKK-2) resulta en la translocación del NF- κ B activado y la subsecuente transcripción de mediadores inflamatorios (55). Las interacciones de LPS con TLR desencadenan la activación de NF- κ B.

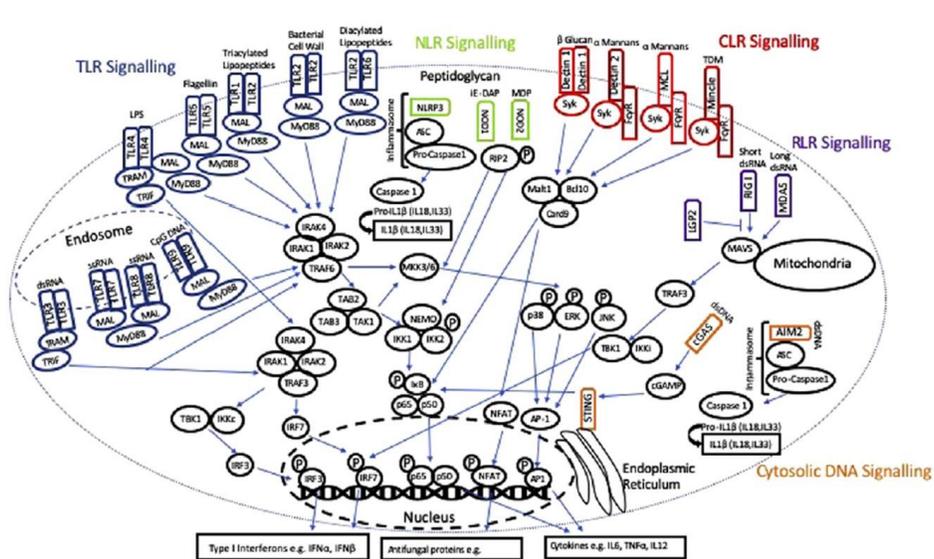


Figura 3 activación de los TLR. Se señalan las diferentes activaciones de los receptores de tipo Toll. Imagen tomada de Mckernan 2019.

La inflamación es necesaria para la eliminación bacteriana; sin embargo, la respuesta inflamatoria aguda se asocia con una eliminación bacteriana y una

mayor morbilidad del huésped. Los niveles elevados de citocinas proinflamatorias se correlacionan con la destrucción inmunomediada del parénquima pulmonar como es el caso en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (56). La fibrosis, es la consecuencia frecuente del intento del cuerpo de resolver el círculo vicioso de inflamación y lesión epitelial de las vías respiratorias, y a menudo resulta en lesiones que comprometen la integridad funcional del pulmón afectando el intercambio de gases con tejido cicatricial.

2.7 microRNA (miRNAs)

Diversas investigaciones han demostrado el papel de los microRNA (miRNAs) en la regulación de la respuesta inflamatoria, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (6) y en la expresión en diferentes patologías pulmonares humanas (7, 8); sin embargo, existen pocos datos experimentales que demuestren la expresión diferencial de los miRNA y de las vías proinflamatorias en el tejido respiratorio.

Los miRNA son una clase de RNA no-codificante, monocatenarios de secuencias cortas (20-23 nucleótidos de longitud), endógenos que regulan la expresión génica. Los miRNAs se transcriben inicialmente mediante RNA polimerasa II o RNA polimerasa III, como un transcrito de miRNA primario largo (pri-miRNA). A continuación, se escinde en el núcleo mediante el complejo de microprocesador, Drosha-DGCR8, que da como resultado una horquilla precursora (pre-miRNA) que varía en longitud de 60 a 110 nucleótidos. El pre-miRNA se exporta desde el núcleo al citoplasma mediante exportina-5-Ran-GTP. En el citoplasma, Dicer, un miembro de la familia RNasa III, en complejo con TRBP, escinde la horquilla pre-miRNA a un dúplex de miRNA de aproximadamente 22 pb. El miRNA maduro se incorpora con proteínas argonauta (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde el miRNA dirige el complejo a sitios de unión complementarios parciales ubicados en la región 3' no traducida (UTR) de los mRNA diana para suprimir la expresión génica. Un informe reciente sugiere que

los sitios de unión a miRNA también se producen dentro de la UTR 5' y en la región codificante (57). Durante mucho tiempo se creyó que la complementariedad parcial favorece la inhibición de la iniciación de la traducción; sin embargo, estudios recientes sugieren que los miRNAs actúan predominantemente para disminuir los niveles de mRNA diana, al menos en mamíferos.

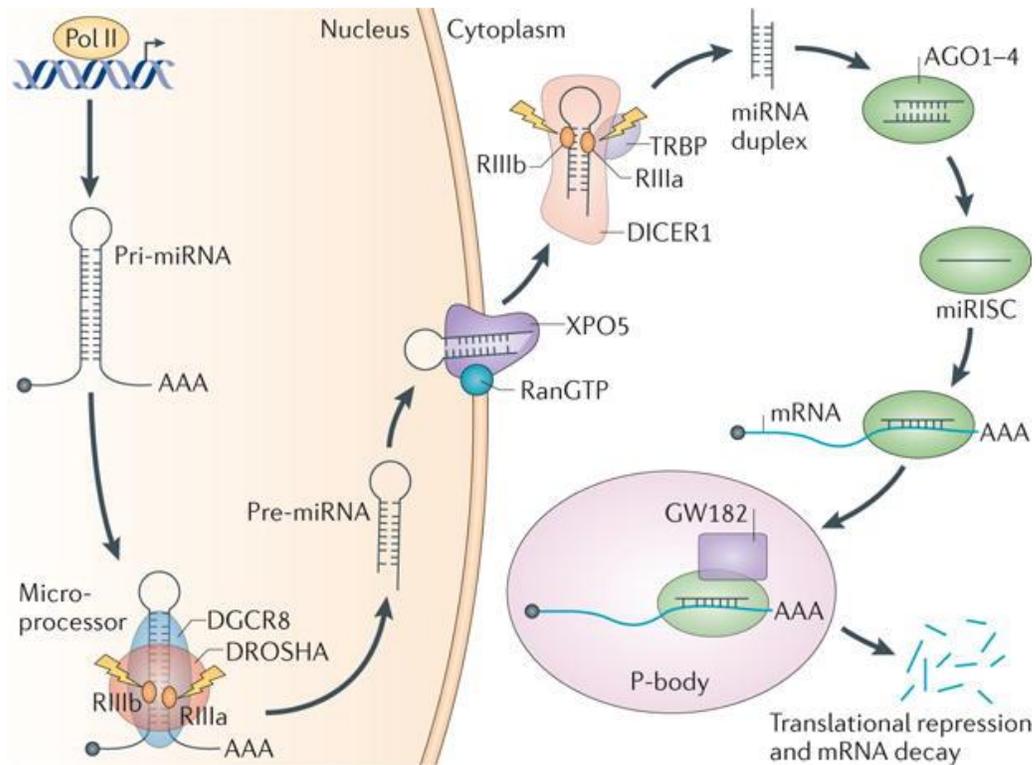


Figura 3. Biogénesis de los miRNAs Se señalan cada uno de los pasos para la liberación de los miRNAs maduros. Obtenido de Lin S, 2015.

2.7.1 MiRNA-21 en procesos inflamatorios

El miR-21 está codificado en el cromosoma 17q23.2 dentro del gen codificador TMEM49 (también denominado proteína de membrana de vacuolar). A pesar de

estar ubicado en regiones intrónicas de un gen codificador en la dirección de la transcripción, tiene sus propias regiones promotoras y forma una transcripción primaria larga de ~ 3433 nt de miR-21 (conocida como pri-miR-21) que se transcribe independientemente. El precursor de tallo-lazo de miR-21 (pre-miR-21) reside entre los nucleótidos 2445 y 2516 de pri-miR-21. La secuencia madura de miR-21 está fuertemente conservada a lo largo de la evolución.

El miR-21 se encuentra asociado a diferentes patologías y funciones del sistema inmunológico como la maduración de células hematopoyéticas y su expresión aumenta significativamente a medida que varios tipos de células maduran a un estado "activo", incluyendo células derivadas de médula ósea (58), neutrófilos (59) y células T activadas de varios linajes (60). El incremento en los altos niveles de miR-21 son, por lo tanto, un marcador de la activación de las células inmunitarias, aunque aún no se ha determinado si esto refleja una causa o consecuencia de la activación.

Lu y colaboradores (2009) demostraron en ratones a los cuales se les indujo experimentalmente alergia pulmonar el incremento en la expresión del miR-21 por efecto de la respuesta inflamatoria (61). La expresión de miR-21 también aumenta en la enfermedad alérgica esofagitis eosinofílica (EoE) (62). Por lo tanto, miR-21 parece ser un biomarcador para la enfermedad alérgica de tipo Th2. Funcionalmente, miR-21 puede promover respuestas Th2 por dos vías diferentes. En primer lugar, miR-21 puede reprimir la expresión del gen IL-12, inhibiendo así las respuestas Th1 y favoreciendo las respuestas Th2 (63). En segundo lugar, miR-21 puede promover directamente la diferenciación de Th2 en una forma intrínseca de células T, al aumentar la expresión de Gata3 e IL-4 en puntos tempranos después de la activación de las células T (64). Se ha demostrado que regula la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 en macrófagos en respuesta a LPS-bacteriano, al dirigirse a PDCD4, un regulador negativo de la traducción de IL-10 (65, 66).

Se ha demostrado que el miR-21 es un modulador en la diferenciación y activación de macrófagos hacia un fenotipo de tipo M2 (67). Aunque el papel de miR-21 en la respuesta del huésped a los patógenos bacterianos es relativamente inexplorado, esto implica un papel potencialmente importante para miR-21 en el control de la infección.

2.7.2 MiRNA-126 en procesos inflamatorios

miR-126 tiene 21 nucleótidos de longitud, se encuentra en el cromosoma 9q34.3 y está contenido dentro del intrón 5 del factor de crecimiento epidérmico (68), su expresión es alta en tejidos vascularizados, como el pulmón, el corazón y el riñón (69), y en el epitelio bronquial (70). En estudios recientes, han demostrado que miR-126 tiene papeles funcionales en la angiogénesis (71), se regula negativamente en una serie de tumores malignos (72) y actúa como un supresor tumoral en el cáncer de mama (73). Se demostró que miR-126 era esencial para el mantenimiento de la integridad vascular y la angiogénesis in vivo en ratones y pez cebra (71). MiR-126 y miR-335 se pierden específicamente a medida que las células de cáncer de mama se mueven hacia la metástasis y, en consecuencia, se ha sugerido que estos miRNA funcionan como miRNA supresores de metástasis en el cáncer de mama humano. Su reintroducción en las células de cáncer de mama in vivo condujo a la reducción del crecimiento tumoral, la proliferación y la inhibición de la invasión (73).

Oglesby y colaboradores (2010) demostraron en pacientes con evidencias clínicas de fibrosis cística la disminución significativa en la expresión del miR-126 con respecto a pacientes sanos (74). Estos mismos autores demostraron que el miR-126 regula la vía de señalización de la proteína Myb (TOM1). TOM1 es un miembro de una familia de proteínas que contiene un dominio N-terminal VHS (Vps27p / Hrs / STAM) y forma un complejo con la proteína Toll-interacción (Tollip), regulando la señalización de TLR2, TLR4 e IL-1RI(OGLESBY, 2010

PMID 20083669). Este complejo formado por el miR-126/TOM1/TLRs regula el tráfico endosomal de proteínas ubiquitinadas incrementando la respuesta inflamatoria (75) regulando al receptor de tipo IL-1RI al endosoma para su degradación inhibiendo la interacción con la citocina IL-1 β (76). Se ha demostrado que la proteína TOM1 regula inhibiendo las vías de señalización inducidas por IL-1 β y TNF- α (76).

La sobreexpresión de miR-126 disminuyó la producción de proteína TOM1 en las células epiteliales bronquiales de la CF y disminuyó la actividad de luciferasa en un gen reportero que contenía la 3'UTR de TOM1. Después de la estimulación con LPS o IL-1 β , se descubrió que la sobreexpresión de TOM1 regula negativamente la actividad de NF- κ B mediante ensayo de luciferasa. Por el contrario, la reducción de TOM1 resultó en un aumento significativo en la secreción de IL-8 regulada por NF- κ B, lo que sugiere que miR-126 puede tener un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes innatas en el pulmón con CF (74).

Se ha demostrado que las vías de señalización del LPS y de la IL-1 β , y del TNF- α no tuvieron efectos sobre la expresión de miR-126 e inhibe a la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM1), proponiéndolo al miR-126 como regulador de la respuesta inflamatoria (77).

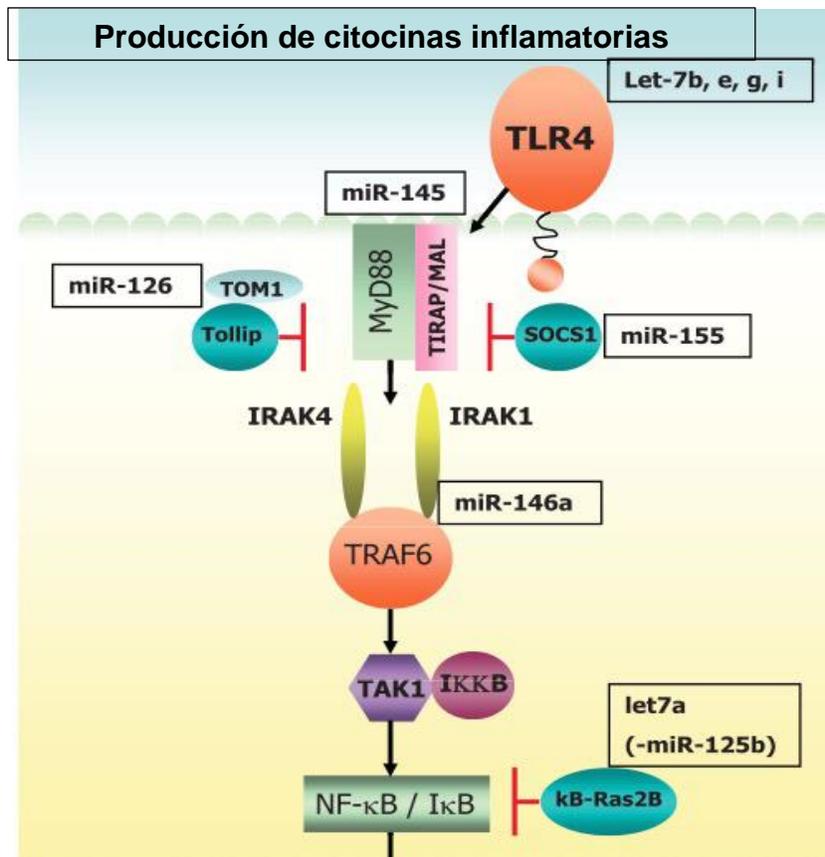


Figura 4. Activación de las vías NF-κB. Muestra la vía de activación de NF-κB mediante la unión al receptor TLR4. Tomada de Oglesby y colaboradores (2010)

2.7.3 miRNA-146 en procesos inflamatorios

MiR-146 está codificado en el cromosoma humano 5q33.3 se expresa ampliamente en células de mamífero (78). Diversos estudios han demostrado que el miR-146 interactúa directamente con la proteína cinasa asociada al receptor de la IL-1 (IRAK1), y a la proteína del factor asociado al receptor del TNF-6 (TRAF6), y por lo tanto participa en la regulación de las respuestas inflamatorias (79). Schulte y colaboradores (2013) demostraron en fibroblastos embrionarios de ratón que miR-146 regula la vía de señalización del TLR4 y con la proteína del dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD2) activadas por la estimulación del LPS (78).

O'Leary y colaboradores (2016) demostraron el papel de la expresión de miRNA-146a y miRNA-146b inducida por IL-1 β y la liberación de las quimiocinas proinflamatorias, IL-8 y RANTES. Se demostró que miRNA-146a y, en menor medida, miRNA-146b, son fundamentales para la regulación de retroalimentación negativa de la inflamación inducida por IL-1 β . Además, que la expresión y la acción de miRNA-146a se observa a altas concentraciones de IL-1 β , lo que indica que este mecanismo de retroalimentación negativa solo se activa durante la inflamación severa. Finalmente, demostraron que la inhibición de miR-146a aumenta la liberación de IL-8 y RANTES, mientras que la sobreexpresión de miR-146a usando imitadores atenuó esta respuesta (80).

3.0 JUSTIFICACIÓN

El papel de los miRNAs ha sido ampliamente estudiado en enfermedades pulmonares inflamatorias; sin embargo, no se ha estudiado el perfil de expresión durante el desarrollo infeccioso con *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo que se plantea un modelo experimental de infección *in vitro* en la línea celular de neumocitos secretores tipo-II (A549).

4.0 OBJETIVOS E HIPOTESIS

4.1 Objetivo general

Determinar el perfil de expresión de tres miRNAs en el medio de cultivo de las células A549 estimuladas con *Pseudomonas aeruginosa* a las 3, 6 y 24 horas.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el perfil de expresión del mir-21,-126, y -146 por las células A549 estimuladas con diferentes unidades formadoras de colonias de *P. aeruginosa* a las 3, 6 y 24 h.
2. Identificar que miRNAs presentaron un cambio en el nivel de expresión de 2-veces con respecto al grupo sin estimulación.

5.0 HIPÓTESIS

Pseudomonas aeruginosa modulará la expresión diferencial de los miRNAs en las células A549 con respecto al tiempo de estimulación y a la concentración bacteriana.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Establecimiento de la línea celular

La línea celular de NSTII, A549 (ATCC, CCL-185) fue expandida como ha sido previamente reportada por nuestro grupo de investigación (81). El criovial de las células A549 se puso en una botella de 25cm² (Corning) medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen, CA, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, Bethesda, MD, USA) y 1% de la mezcla de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, Gibco, Bethesda, MD, USA). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia celular mayor al 95%. Posteriormente se disgregaron usando una solución de tripsina (Invitrogen, CA, USA) al 10% durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron a 1,400 rpm durante 5 minutos y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de medio suplementado y se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer con azul de tripano para diferenciar entre células muertas (que se tiñen de azul) de las células vivas con membranas íntegras (incolores). Una vez realizado el conteo celular, se hicieron los cálculos necesarios para colocar en placas de 12 pozos, 152,000 células vivas por cada pozo en 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con antibiotico y suero. Para cada uno de los ensayos de estimulación bacteriana, se prepararon 3 cajas de 12 pozos, cada una correspondiente a cada intervalo. Las cajas fueron incubadas durante 12 horas a 37°C con 5% de CO₂.

6.2 *Pseudomonas aeruginosa*

La cepa de *P. aeruginosa* (ATCC27850) utilizada para el desarrollo del presente trabajo ha sido tipificada previamente por nuestro equipo de investigación (81). La tipificación consistió en la expansión de la bacteria en 2 placas de gelosa soya tripticaseína (TSA; BD, Nueva Jersey) a 37°C durante toda la noche. A partir del crecimiento en estas placas se describió la morfología colonial, se verificó la

producción de los pigmentos pirocianina y fluoresceína en las placas. El ensayo de susceptibilidad se realizó en placas con antibiótico por difusión en disco.

6.3 Estimulación de las células A549 con *P. aeruginosa*.

En esterilidad, se realizó una suspensión del cultivo proporcionado de *P. aeruginosa* utilizando solución salina estéril (SS) y se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro de Mcfarland. La monocapa de las células A549 se les retiró el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con 500 μ L de SS cuidando de no dañar a las células; posteriormente se les adicionó 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado sin antibiótico. Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Se realizaron los cálculos necesarios para colocar cada una de las diferentes UFC/mL de *P. aeruginosa*. Se recuperó el medio de cultivo de cada placa a las 3, 6 y 24 horas post-estimulación.

6.4 Extracción del RNA total

Se extrajo el RNA total de los medios recuperados mediante la técnica de trizol en la cual se agregó 500 μ l de trizol con 500 μ l de medio el cual fue incubado 15 minutos a 30°C al cual se le administró 100 μ l de cloroformo y se incubo 3 min a 30°C, posteriormente se centrifugo 15 min a 4000rpm a -4°C con lo cual se obtendrán tres fases. La fase superior (fase acuosa donde se halla el RNA) fue depositada en un tubo Eppendorf estéril y se le agrego 500 μ L de isopropanol y 1 μ l de glucógeno, y se incubo durante 1 hora a -20°C. Posteriormente el tubo Eppendorf fue centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos a -4°C. El sobrenadante fue decantado y al pellet se le adicionó etanol al 100% y se centrifugo nuevamente, el procedimiento se repitió nuevamente con la adición de etanol al 75%. Finalmente, el tubo fue incubado toda la noche a temperatura ambiente para la evaporación del alcohol. Las muestras fueron hidratadas con 20 μ l de agua estéril y se cuantifico el RNA total midiendo la relación de A_{260/280} en el espectrofotómetro (NanoDrop One, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

6.5 Reacción de RT

Las condiciones para la obtención del cDNA mediante la técnica de retrotranscripción (RT), y la amplificación de los miRNAs ha sido previamente descritas por nuestro grupo de investigación (González-Acuña, 2021 *en prensa*) las cuales se describen a continuación.

El RNA total se sometió a la técnica de retrotranscripción (RT) para la obtención del cDNA en la cual se preparó una mezcla con 9 ng del RNA, MgCl₂ 25 mM, Reverse Transcription 10x Buffer, dNTP (10 mM), RNA sin ribonucleasa, Oligo (dT)₁₅ primer, AMV Reverse Transcriptase, e iniciadores específicos para cada miRNA (Tabla 1) y con un volumen de 10 microlitros de ddH₂O. Esta mezcla fue incubada por 45 min a 45°C.

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores de cada miRNA para la RT

miRNA	SECUENCIA (5´- 3´)
-21	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CAG CC
-126	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC CGA CTG GAT ACG ACT TAC GC
-146	GCT GTA TCC AGT GCA GGG TCCC GGG TAT TCG CAC TGG ATA CGA CAA CCC A

La secuencia se obtuvo de la bases de datos de miRbase.

6.6 Reacción de PCR

Posteriormente el cDNA se amplificó por PCR con la mezcla de cDNA, MgSO₄ 25mM, 5x Colorless GoTaq Flexi Buffer, dNTP mix 10mM, Oligo Universal, e iniciadores específicos para cada miRNA (Tabla 2), GoTaq Flexi DNA Polymerase y H₂O el cual se procesó en un termociclador (Techne Touchgene gradient) a una temperatura de 95°C en 35 ciclos (95°C durante 15 minutos; 95°C durante 1 minuto; temperatura específica del iniciador específico durante 1

minuto; y 72 °C durante 1 minuto para la extensión) y una extensión final a 74°C durante 10 minutos.

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores de cada miRNA de PCR.

miRNA	SECUENCIA (5´- 3´)
-21	CGG CCG CAA CAC CAG T
-126	GCC GAG CAT GGC TCT C
-146	CGG CCG ACT CTT GAC

La secuencia se obtuvo de las bases de datos de miRbase.

Finalmente, los amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 4% y el corrimiento electroforético se realizó a 60 V y a temperatura constante por 40 minutos. Las bandas de expresión fueron visualizadas en el transiluminador para luz ultravioleta (Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cada banda de expresión se le determinó la densidad óptica mediante el programa de ImageJ (NIH, USA) como ha sido descrito previamente por nuestro grupo de investigación (González-Acuña, 2021 *en prensa*).

6.7 Análisis estadístico

Los datos de expresión fueron reportados como la media \pm desviación estándar y la comparación entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de ANOVA de una sola vía seguida de la Tukey con una diferencia estadística menor a 0.05

RESULTADOS

El perfil genético de las células A549 fue determinada mediante la amplificación de 21 marcadores los cuales correspondieron con la clona de la línea celular humana A549 del ATCC identificada como CCL-185, y no existieron evidencias de que la muestra estuviera contaminada con otro tipo de células humanas.

Las características morfológicas y bioquímicas (tabla 3), así como la prueba de susceptibilidad a 17 antibióticos por el método de difusión en disco (tabla 4) de la cepa bacteriana determino que esta corresponde con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a lo establecido por la CLSI (Clinical and Laboratory Estandars Institute) (82).

Tabla 3. Tipificación morfológica y bioquímica de la cepa de *P. aeruginosa*.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
Morfología	
<i>Microscópica</i>	Bacilos Gram-negativos
<i>Colonial (gelosa sangre)</i>	Colonias circulares, β hemolíticas, 3-4 mm Ø, planas, de borde entero, lisas, brillantes, opacas, húmedas, consistencia mucoide, color grisáceo. Olor característico.
Bioquímica	
<i>KIA</i>	K/K -, -
<i>MIO</i>	+, -, -
<i>Citrato de Simmons</i>	+
<i>Piocianina</i>	+
<i>Fluoresceína</i>	+

Gelosa sangre (GS), agar hierro de Kligler (KIA; por sus siglas en inglés, Kligler Iron Agar), Movilidad Indol Ornitina (MIO). Prueba: positiva (+), negativa (-). * Los detalles de la interpretación de las pruebas bioquímicas se encuentran en el anexo II

Tabla 4. Tabla 4. Sensibilidad a antibióticos por el método de difusión en disco

Antibiótico	Ø halo de inhibición	Resultado
Cloranfenicol (C)	0 mm	R
Ciprofloxacín (CIP)	29mm	S
Timetoprim-Sulfmetoxazol (STX)	0 mm	R
Amikacina (AK)	29 mm	S
Aztreonam (ATM)	23 mm	S
Gentamicina (GN)	20 mm	S
Tetraciclina (TE)	11 mm	R
Norfloxacino (NOR)	24 mm	S
Sulfonamidas compuestas (S3)	0 mm	R
Penicilina-Tazobactam (TZP)	23 mm	S
Ceftriaxona (CRO)	26.5 mm	S
Piperaciclina (PRL)	0 mm	R
Carbenicilina (CAR)	25 mm	S
Cefoperazone (CFP)	25 mm	S
Cefepime (FEP)	27.5 mm	S
Meropenem (MEM)	0 mm	R
Ceftazidina (CAZ)	0 mm	R

*Resistente (R), sensible (S).

Con la confirmación de identidad de las células A549 y la tipificación bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* se prosiguió a realizar los ensayos de expresión del miR-21 (figura 9), miR-126 (figura 10), y miR-146 (figura 11) en cada una de las condiciones experimentales de estimulación.

7.1 Expresión de miRNAs en las células A549 estimuladas con *P. aeruginosa*.

7.1.1 miR-21

La figura 6 muestra el perfil de expresión del miR-21 a las 3 (fig. 6A), 6 (fig. 6C), y 24 horas (fig. 6E) y a cada banda de expresión se determinó su densidad óptica correspondiente (fig. 6B, D, y F). La expresión se obtuvo en el medio de cultivo de las células A549 después de su estimulación con diferentes unidades formadoras de colonias de *P. aeruginosa*.

A las 3 horas de estimulación con 10^2 , 10^4 , y 10^5 UFC/mL de *P. aeruginosa* no observamos cambios en los niveles de expresión del miR-21 con respecto al grupo control (fig. 6B); sin embargo, la estimulación con 10^6 UFC/mL aumenta significativamente 1.3-veces la expresión del miR-21 con respecto al grupo control (851 ± 24 , $p \leq 0.001$; figura 6B).

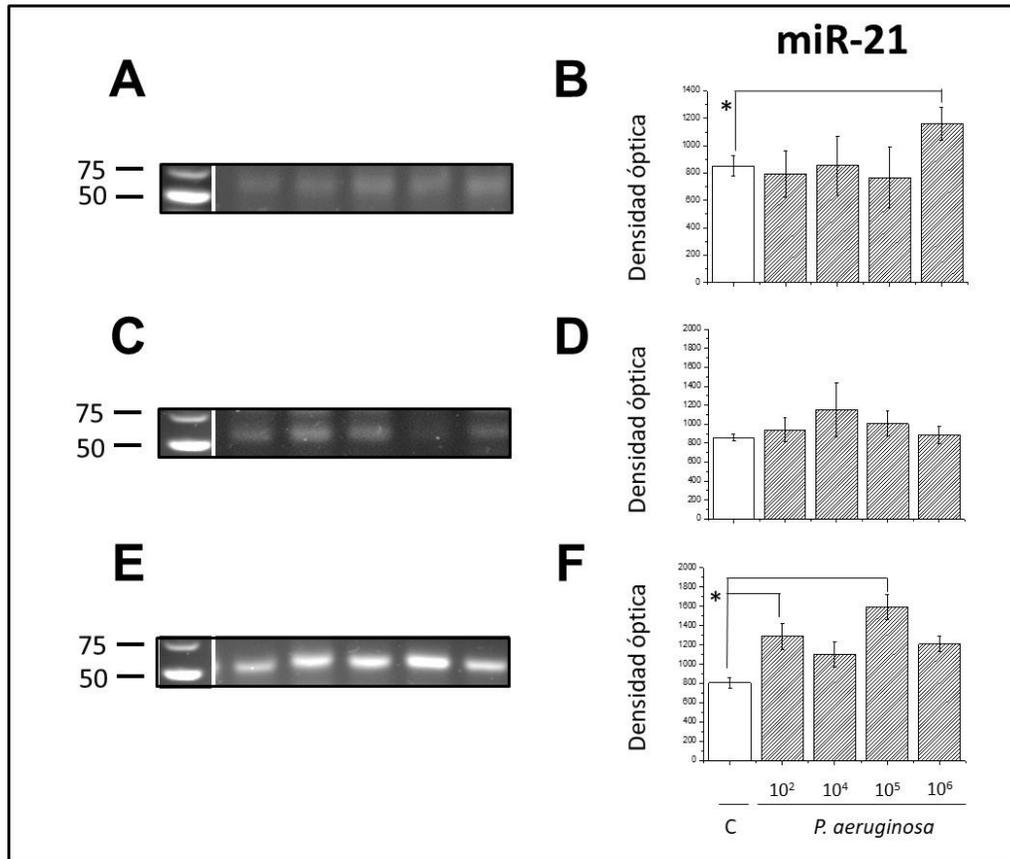


Figura 5. Perfil de expresión del miR-21 después de estimular a las células A549 con *Pseudomonas aeruginosa*. Se indica la banda de expresión que corresponde a 73 nucleótidos la cual fue detectada tanto en las células A549 del grupo control (carril 1), como en las diferentes concentraciones de estimulación con *P. aeruginosa* a diferentes UFC 10² (carril 2), 10⁴ (carril 3), 10⁵ (carril 4) y 10⁶ (carril 5). Mediante el programa de ImageJ (NIH, USA) se determinó en cada caso la densidad óptica relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F). Se utilizó el marcador de peso molecular de 10 nucleótidos (PM; invitrogen). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa * con respecto al grupo control ($p \leq 0.001$).

A las 6 horas de estimulación *P. aeruginosa* (10⁴ UFC/mL) aumenta 1.3-veces la expresión del miR-21; sin embargo, no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control (858 \pm 39, figura 6B).

Finalmente, a las 24 horas de estimulación con *P. aeruginosa* 10^2 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL observamos un aumento significativo de 1.5-, 1.9-, y 1.4-veces respectivamente en la expresión del miR-21 con respecto al grupo control (858 ± 39 , $p \leq 0.001$, fig. 6F).

7.1.2 miR-126

La figura 7 muestra el perfil de expresión del miR-126 a las 3 (fig. 7A), 6 (fig. 7C), y 24 horas (fig. 7E) y a cada banda de expresión se determinó su densidad óptica correspondiente (fig. 7B, D, y F). La expresión se obtuvo en el medio de cultivo de las células A549 después de su estimulación con diferentes unidades formadoras de colonias de *P. aeruginosa*.

En ninguna de las condiciones de tiempo (3, 6, y 24 horas) y de estimulación con *P. aeruginosa* (10^2 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL) no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del miR-126 con respecto al grupo control ($p = 0.578$).

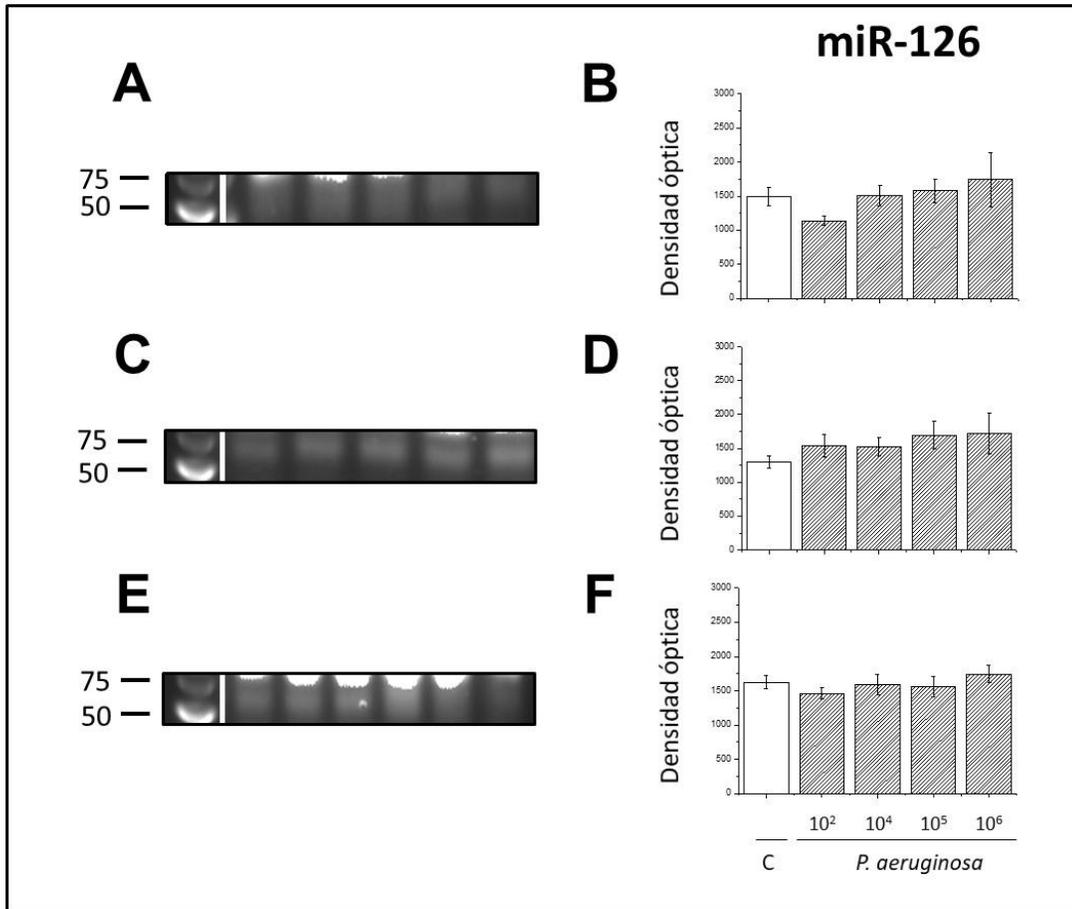


Figura 6. Perfil de expresión del miR-126 después de estimular a las células A549 con *Pseudomonas aeruginosa*. Se indica la banda de expresión que corresponde a 73 nucleótidos la cual fue detectada tanto en el grupo control (carril 1), como en las diferentes concentraciones de estimulación con *P. aeruginosa* a 10^2 (carril 2), 10^4 (carril 3), 10^5 (carril 4) y 10^6 (carril 5). Mediante el programa de ImageJ (NIH, USA) se determinó en cada caso la densidad óptica relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F). Se utilizó el marcador de peso molecular de 10 nucleótidos (PM; invitrogen). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa * con respecto al grupo control ($p \leq 0.001$).

7.1.2 miR-146

La figura 8 muestra el perfil de expresión del miR-146 a las 3 (fig. 8A), 6 (fig. 8C), y 24 horas (fig. 8E) y a cada banda de expresión se determinó su densidad óptica correspondiente (fig. 8B, D, y F). La expresión se obtuvo en el medio de cultivo

de las células A549 después de su estimulación con diferentes unidades formadoras de colonias de *P. aeruginosa*.

A las 3 horas de estimulación con 10^2 , y 10^4 UFC/mL de *P. aeruginosa* no observamos cambios en los niveles de expresión del miR-146 con respecto al grupo control (fig. 8B; $p = 0.632$); sin embargo, la estimulación con 10^5 , y 10^6 UFC/mL aumentaron significativamente 1.2-veces la expresión del miR-146 con respecto al grupo control (1366 ± 55 , $p \leq 0.004$; figura 8B).

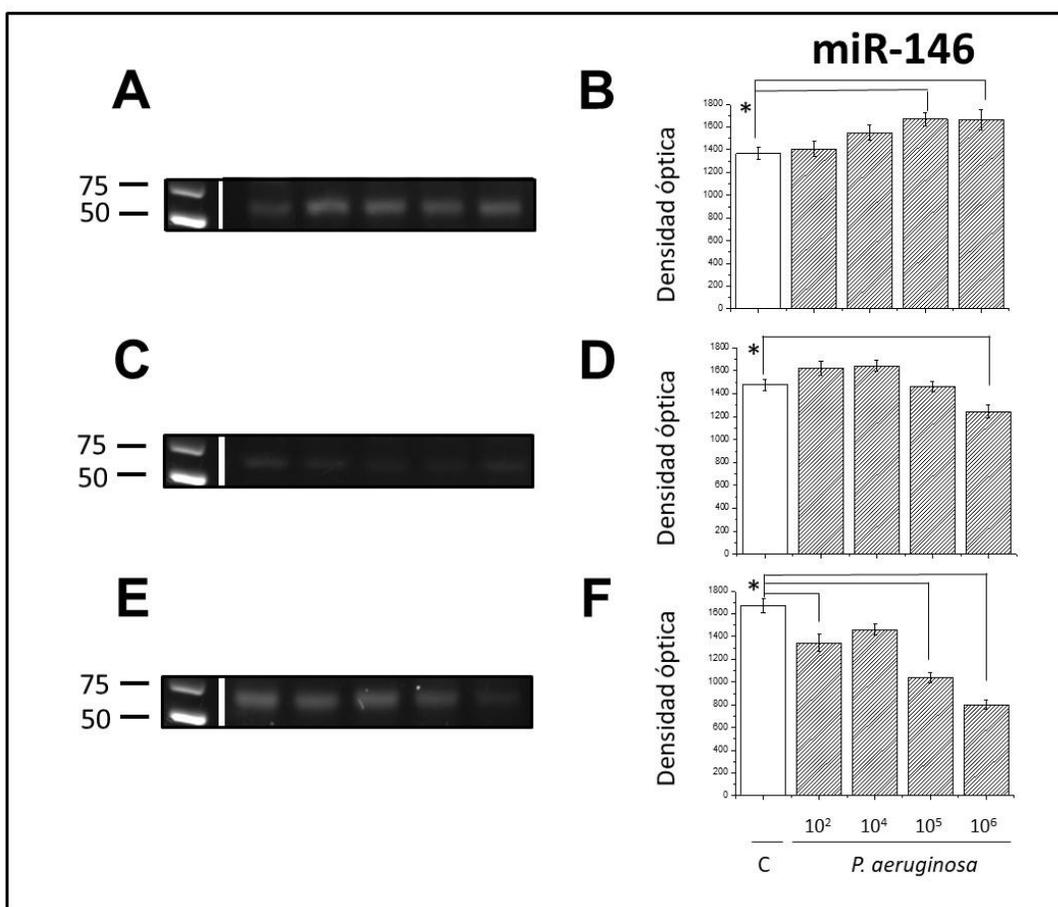


Figura 7. Perfil de expresión del miR-146 después de estimular a las células A549 con *Pseudomonas aeruginosa*. Se indica la banda de expresión que corresponde a 73 nucleótidos la cual fue detectada tanto en el grupo control (carril 1), como en las diferentes concentraciones de estimulación con *P. aeruginosa* a 10^2 (carril 2), 10^4 (carril 3), 10^5 (carril 4) y 10^6 (carril 5). Mediante el programa de ImageJ (NIH, USA) se determinó en cada caso la densidad óptica relativa a las 3 (B), 6 (D) y 24 horas (F). Se utilizó el marcador de peso molecular de 10 nucleótidos (PM; invitrogen). Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar y se indica la diferencia estadísticamente significativa * con respecto al grupo control ($p \leq 0.001$).

A las 6 horas de estimular a las células A549 con *P. aeruginosa* (10^2 , 10^4 , y 10^5 UFC/mL) no observamos cambios en la expresión del miR-146 con respecto al grupo control (1478 ± 47 , $p = 0.617$; fig. 8); sin embargo, la estimulación con 10^6 UFC/mL observamos una disminución estadísticamente significativa de 1.18-veces la expresión del miR-146 con respecto al grupo control (1478 ± 47 , fig. 8D).

Finalmente, a las 24 horas de estimulación con *P. aeruginosa* 10^2 , 10^5 , y 10^6 UFC/mL observamos una disminución significativa de 1.2-, 1.1-, 1.6-, y 2.0-veces respectivamente en la expresión del miR-146 con respecto al grupo control (1673 ± 58 , $p \leq 0.001$, fig. 8F).

En los miRNAs analizados no encontramos en las diferentes condiciones de estimulación y con respecto al tiempo variaciones en su expresión superiores a dos veces con respecto al grupo control.

8.0 DISCUSIÓN

Los miRNAs juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria (83, 84), y en el desarrollo de patologías humanas (85, 86) por lo que se les ha considerado como posibles biomarcadores (87, 88).

La figura 9 describe un modelo conceptual sobre la participación de los miRNAs en las células A549 estimuladas con *Pseudomonas aeruginosa* basado en los principales resultados en el presente estudio los cuales indican que: 1) en las fases iniciales de la estimulación *Pseudomonas aeruginosa* induce en las células A549 la expresión del miR-21 y del miR-146 de manera dosis dependiente; 2) en las fases finales de la estimulación la expresión del miR-21 reduce al miR-146; y 3) el miR-126 no cambia su nivel de expresión con respecto al tiempo de estimulación.

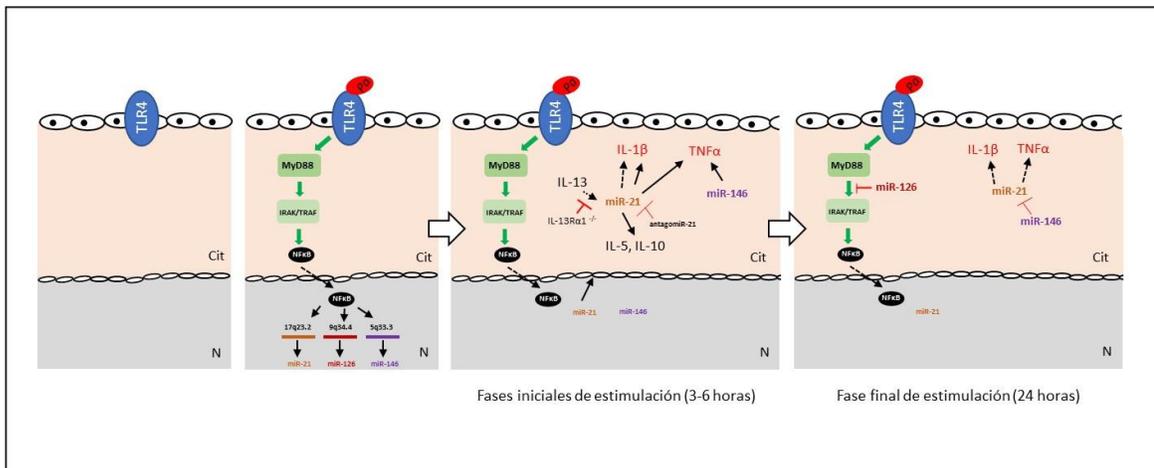


Figura 9 Mecanismo de acción de los miRNAs en la respuesta inflamatoria en las células A549 estimuladas con *Pseudomonas aeruginosa*. El lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) al ser reconocido por el TLR4 promueve la vía de señalización MyD88/IRAK/TRAF activando al factor nuclear de transcripción (NFκB) expresando al miR-21, miR-146 promoviendo en la fase inicial la secreción de la IL-1β y del TNFα. Se sugiere que en la fase final de la estimulación el miR-146 pudiera regular la expresión del miR-21 por lo que la secreción de la IL-1β y del TNFα se inhibiría.

Lu y colaboradores (2009) demostraron que la inoculación intranasal de *Aspergillus fumigatus* (100 µg) induce la secreción de IL-13 la cual aumenta la expresión del miR-21 (fig. 9). Este mecanismo de regulación fue demostrado con ratones transgénicos (IL-13Rα1^{-/-}) en los cuales la inhibición de la IL-13 reduce la expresión del miR-21 (61). Recientemente, Lee y colaboradores (2021) demostraron mediante ratones miR-21-knockout su papel inmunológico tanto para la reclutación de células inmunológicas alveolares (macrófagos, eosinófilos, linfocitos y neutrófilos) como en la secreción de la respuesta inflamatoria (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, e IFNγ) (89). Se ha demostrado que los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) son una clase de factores transcripcionales involucrados con la diferenciación de adipocitos (90), oxidación de ácidos grasos (91), y como regulador de la respuesta inflamatoria promoviendo la inactivación del NF-KB (92). Recientemente, Du y colaboradores (2020) demostraron en ratones a los que se les inyectó LPS (5 mg/Kg) la expresión del miR-21 el cual aumentó la concentración de TNFα y de IL-1β, y este efecto es inhibido por su antagonista (antagomir-21) (fig. 9).

Finalmente, los autores demostraron que el mecanismo de acción entre miR21/TNFα/IL-1β está mediado por PPARα (93). Nuestros resultados demuestran que al estimular a las células A549 con diferentes UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa* se incrementa la expresión del miR-21 de manera dosis dependiente y con respecto al tiempo de estimulación (fig. 9). Aunque en el presente estudio no demostramos el incremento de las citocinas inflamatorias; recientemente, nuestro grupo de investigación ha reportado en el mismo modelo experimental de infección el incremento de IL-1β y de TNFα a las 3 horas de estimulación con *P. aeruginosa* (10⁵ y 10⁶ UFC/mL) teniendo su máxima concentración a las 24 horas (81).

La vía de señalización inflamatoria está modulada por el factor transcripcional-1 (TOM1) que al interaccionar con las proteínas toll (TOLLIP) reduce la secreción de la IL-1β, y del TNFα (94, 95). Oglesby y colaboradores (2010) demostraron

mediante ensayos bioinformáticos que uno de los blancos moleculares del miR-216 es el TOM1 y determinaron en células humanas del epitelio bronquial (CFBE41o) transfectadas con el miR-126 se reduce la proteína TOM1 incrementando la concentración de IL-1 β , y del TNF α (74) (fig. 9). En el mismo estudio, los autores determinaron que en pacientes con fibrosis cística la reducción en la expresión del miR-126 lo que contribuye a fases agudas de la respuesta inflamatoria (74). Li y colaboradores (2021) demostraron en células HUVEC expuestas por cuatro horas a estrés de oxígeno (hipoxia) una reducción en la viabilidad celular, el incremento en el porcentaje de células apoptóticas, y el aumento en la concentración de IL- β , -6, TNF α , y la disminución de la IL-10. En estas condiciones las células HUVEC al ser transfectadas con el miR-126 (50 nM) aumentaron la viabilidad celular (80%) y redujeron el porcentaje de células apoptóticas (15%), y disminuyeron la concentración de IL- β , -6, TNF α en 2.3-, 2.0-, 1.6-veces respectivamente, y aumentando 1.8-veces la concentración de la IL-10 con estrés de oxígeno (96). Nuestros resultados sugieren que las células A549 deben de eliminar al estímulo que las activo por lo que no encontramos cambios significativos en la expresión del miR-126 con respecto al grupo control (fig. 7).

Se ha demostrado que el miR-146 participa activamente en la inmunidad innata (97, 98). Nahid y colaboradores (2009) determinaron en la línea celular de leucemia monocítica humana (THP-1) la cual fue estimulada con LPS-*Salmonella entérica* (10, 100, y 1000 ng/mL) por 2, 4, 8, y 24 horas. A las 4 horas de estimulación, se determinó que el TNF α fue la principal citocina inflamatoria y en menor concentración fue la IL-1 β , e IL-6. Este perfil inflamatorio disminuyó a las 24 horas de estimulación. Los autores demostraron mediante el ensayo de Western blot que la vía de señalización de la respuesta inflamatoria esta la activación de IRAK-1 (interleucina (IL) -1R-quinasa asociada) /TRAF6 (TNF-receptor asociado factor 6). En la misma cinética demostraron que la expresión del miR-146 aumenta significativa a las 8, 12 y 24 horas de estimulación (97). Las células THP-1 al ser transfectadas con 20 μ M del miR-146 se disminuyó 4-veces

la secreción del TNF α , IL-1 β , e IL-6. Finalmente, los autores demostraron que el miR-146 reduce la detección de las proteínas de IRAK-1/TRAF6 como ha sido previamente demostrado por los ensayos bioinformáticos (98).

Perry y colaboradores (2008) demostraron que al estimular diferentes tipos de células bronquiales (A549, Beas2B, THP-1, y células epiteliales bronquiales primarias) con IL-1 β (1 ng/mL), por 6 y 24 horas se incrementó 20 veces la expresión del miR-146 el cual fue asociado con el aumento en la concentración de la IL-8, quimiocinas, y del interferón de tipo alfa (IFN α) con respecto al grupo control. Las células al ser transfectadas con antagonista del miRNA-146 se reduce tanto la expresión del miR-146 como la respuesta inflamatoria (99). Los autores demostraron mediante western blot que la señalización esta mediada por vía de IRAK1/TRAF6 la cual se reducida en las células transfectadas.

Contrariamente a lo reportado previamente, nuestros resultados demuestran que la expresión del miR-146 aumenta a las 3 horas de estimulación y su expresión disminuye significativamente a las 6, y 24 horas con respecto al grupo control (fig. 11). Es probables que la represión del miR-146 se deba a la expresión del miR-21 (fig. 9); sin embargo, esta hipótesis deberá de demostrarse mediante otra estrategia experimental. La regulación de miRNAs sobre la expresión de otros miRNAs ha sido descrito por Lu y colaboradores (61) en donde demostraron que la expresión del miR-21 (2.64-veces; $p=0.001$) reprime al miR-1 (0.34-veces; $p=0.001$) con respecto al grupo control.

9.0 CONCLUSIÓN

Los principales resultados en el presente estudio indican que *Pseudomonas aeruginosa* modula diferencialmente la expresión de los miRNAs en las células A549 de manera dosis dependiente y con respecto al tiempo de estimulación.

10.0 REFERENCIAS

1. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth.* 2015;59(9):533-41.
2. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab AE, He M, et al. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest.* 2011;91(3):363-78.
3. O'Reilly MA. Giving New Identities to Alveolar Epithelial Type I Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(3):277-8.
4. Uhl FE, Vierkotten S, Wagner DE, Burgstaller G, Costa R, Koch I, et al. Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures. *Eur Respir J.* 2015;46(4):1150-66.
5. Orgeig S, Hiemstra PS, Veldhuizen EJ, Casals C, Clark HW, Haczku A, et al. Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;173 Suppl:S43-54.
6. Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1779(11):663-7.
7. Lin PY, Yu SL, Yang PC. MicroRNA in lung cancer. *Br J Cancer.* 2010;103(8):1144-8.
8. Moschos SA, Jones SW, Perry MM, Williams AE, Erjefalt JS, Turner JJ, et al. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug Chem.* 2007;18(5):1450-9.
9. Bausinger H, Lipsker D, Hanau D. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2002;23(7):342-3.
10. Ciechanowicz A. Stem Cells in Lungs. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1201:261-74.
11. Mulugeta S, Beers MF. Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2317-23.
12. Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4).
13. Possmayer F, Hall SB, Haller T, Petersen NO, Zuo YY, Bernardino de la Serna J, et al. Recent advances in alveolar biology: some new looks at the alveolar interface. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;173 Suppl:S55-64.
14. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, et al. IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2015;194(9):4507-17.
15. Kumar V. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. *Front Immunol.* 2020;11:1722.
16. Rastrick J, Birrell M. The role of the inflammasome in fibrotic respiratory diseases. *Minerva Med.* 2014;105(1):9-23.
17. Nuriev R, Johansson C. Chemokine regulation of inflammation during respiratory syncytial virus infection. *F1000Res.* 2019;8.
18. Nguyen QT, Furuya Y, Roberts S, Metzger DW. Role of Interleukin-12 in Protection against Pulmonary Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6308-16.
19. Rynda-Apple A, Harmsen A, Erickson AS, Larson K, Morton RV, Richert LE, et al. Regulation of IFN-gamma by IL-13 dictates susceptibility to secondary postinfluenza MRSA pneumonia. *Eur J Immunol.* 2014;44(11):3263-72.

20. Hartmann N, Harriff MJ, McMurtrey CP, Hildebrand WH, Lewinsohn DM, Kronenberg M. Role of MAIT cells in pulmonary bacterial infection. *Mol Immunol*. 2018;101:155-9.
21. Lhert F, Yan W, Biswas SC, Hall SB. Effects of hydrophobic surfactant proteins on collapse of pulmonary surfactant monolayers. *Biophys J*. 2007;93(12):4237-43.
22. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):58-68.
23. Agudelo CW, Samaha G, Garcia-Arcos I. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. *Lipids Health Dis*. 2020;19(1):122.
24. Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1860-3.
25. Zhang F, Jia C, Lin X, Su Z, Wu F, Li Y, et al. The association between surfactant protein B gene variation and bronchopulmonary dysplasia in Chinese premature newborns. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(7):3753-8.
26. Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol*. 2007;9(8):1871-9.
27. Mason RJ, Greene K, Voelker DR. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol*. 1998;275(1):L1-13.
28. Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30871-9.
29. Haagsman HP, Hogenkamp A, van Eijk M, Veldhuizen EJ. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):288-94.
30. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol*. 2006;43(9):1293-315.
31. Alcorn JF, Wright JR. Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(1):L129-36.
32. LeVine AM, Whitsett JA, Hartshorn KL, Crouch EC, Korfhagen TR. Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *J Immunol*. 2001;167(10):5868-73.
33. Marko VA, Kilmury SLN, MacNeil LT, Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. *PLoS Pathog*. 2018;14(5):e1007074.
34. Bucior I, Pielage JF, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002616.
35. Heiniger RW, Winther-Larsen HC, Pickles RJ, Koomey M, Wolfgang MC. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell Microbiol*. 2010;12(8):1158-73.
36. Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47(2):590-2.
37. Hagelueken G, Wiehlmann L, Adams TM, Kolmar H, Heinz DW, Tummeler B, et al. Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(30):12276-81.
38. Wang JD, Li XX, Qu CT. Exploration of Up-regulated Key Proteins in *Pseudomonas Aeruginosa* for High-efficiency Petroleum Degradation by Proteomic Analysis. *Curr Microbiol*. 2017;74(10):1178-84.
39. Morrison AJ, Jr., Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*. 1984;6 Suppl 3:S627-42.

40. Magalhaes B, Valot B, Abdelbary MMH, Prod'hom G, Greub G, Senn L, et al. Combining Standard Molecular Typing and Whole Genome Sequencing to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology in Intensive Care Units. *Front Public Health*. 2020;8:3.
41. Paling FP, Wolkewitz M, Depuydt P, de Bus L, Sifakis F, Bonten MJM, et al. *P. aeruginosa* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *P. aeruginosa* ICU pneumonia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:38.
42. Valles J, Mariscal D, Cortes P, Coll P, Villagra A, Diaz E, et al. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2004;30(9):1768-75.
43. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
44. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, Pfeifer M. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand J Immunol*. 2002;56(3):294-302.
45. Domankevich V, Efrati M, Schmidt M, Glikson E, Mansour F, Shai A, et al. RIG-1-Like Receptor Activation Synergizes With Intratumoral Alpha Radiation to Induce Pancreatic Tumor Rejection, Triple-Negative Breast Metastases Clearance, and Antitumor Immune Memory in Mice. *Front Oncol*. 2020;10:990.
46. Wall AA, Condon ND, Luo L, Stow JL. Rab8a localisation and activation by Toll-like receptors on macrophage macropinosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019;374(1765):20180151.
47. Murase M, Kawasaki T, Hakozaiki R, Sueyoshi T, Putri DDP, Kitai Y, et al. Intravesicular Acidification Regulates Lipopolysaccharide Inflammation and Tolerance through TLR4 Trafficking. *J Immunol*. 2018;200(8):2798-808.
48. Tatematsu M, Funami K, Ishii N, Seya T, Obuse C, Matsumoto M. LRRC59 Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via Association with UNC93B1. *J Immunol*. 2015;195(10):4933-42.
49. Hafner A, Kolbe U, Freund I, Castiglia V, Kovarik P, Poth T, et al. Crucial Role of Nucleic Acid Sensing via Endosomal Toll-Like Receptors for the Defense of *Streptococcus pyogenes* in vitro and in vivo. *Front Immunol*. 2019;10:198.
50. Petes C, Odoardi N, Gee K. The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Front Immunol*. 2017;8:1075.
51. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol*. 2002;3(4):354-9.
52. Magnusson M, Tobes R, Sancho J, Pareja E. Cutting edge: natural DNA repetitive extragenic sequences from gram-negative pathogens strongly stimulate TLR9. *J Immunol*. 2007;179(1):31-5.
53. Benmohamed F, Medina M, Wu YZ, Maschalidi S, Jouvion G, Guillemot L, et al. Toll-like receptor 9 deficiency protects mice against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *PLoS One*. 2014;9(3):e90466.
54. McKernan DP. Pattern recognition receptors as potential drug targets in inflammatory disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;119:65-109.
55. Wietek C, O'Neill LA. Diversity and regulation in the NF-kappaB system. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(7):311-9.
56. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:451-64.

57. Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*. 2010;141(1):129-41.
58. Monticelli S, Lee DU, Nardone J, Bolton DL, Rao A. Chromatin-based regulation of cytokine transcription in Th2 cells and mast cells. *Int Immunol*. 2005;17(11):1513-24.
59. Liu XG, Zhu WY, Huang YY, Ma LN, Zhou SQ, Wang YK, et al. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med Oncol*. 2012;29(2):618-26.
60. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*. 2007;2(10):e1020.
61. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol*. 2009;182(8):4994-5002.
62. Lu TX, Sherrill JD, Wen T, Plassard AJ, Besse JA, Abonia JP, et al. MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1064-75 e9.
63. Lu TX, Hartner J, Lim EJ, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol*. 2011;187(6):3362-73.
64. Sawant DV, Wu H, Kaplan MH, Dent AL. The Bcl6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway. *Mol Immunol*. 2013;54(3-4):435-42.
65. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol*. 2015;6:19.
66. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 2010;11(2):141-7.
67. Xue J, Xiao T, Wei S, Sun J, Zou Z, Shi M, et al. miR-21-regulated M2 polarization of macrophage is involved in arsenicosis-induced hepatic fibrosis through the activation of hepatic stellate cells. *J Cell Physiol*. 2021.
68. Zhang J, Du YY, Lin YF, Chen YT, Yang L, Wang HJ, et al. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(1):136-40.
69. Wang Y, Weng T, Gou D, Chen Z, Chintagari NR, Liu L. Identification of rat lung-specific microRNAs by microRNA microarray: valuable discoveries for the facilitation of lung research. *BMC Genomics*. 2007;8:29.
70. Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, et al. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(4):607-12.
71. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008;15(2):272-84.
72. Saito Y, Friedman JM, Chihara Y, Egger G, Chuang JC, Liang G. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(3):726-31.
73. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-52.
74. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, Stallings RL, O'Neill SJ, McElvaney NG, et al. miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol*. 2010;184(4):1702-9.

75. Katoh Y, Shiba Y, Mitsuhashi H, Yanagida Y, Takatsu H, Nakayama K. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J Biol Chem.* 2004;279(23):24435-43.
76. Brissoni B, Agostini L, Kropf M, Martinon F, Swoboda V, Lippens S, et al. Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr Biol.* 2006;16(22):2265-70.
77. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1516-21.
78. Schulte LN, Westermann AJ, Vogel J. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):542-53.
79. Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Ni J, Zhang XL. MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *J Inflamm (Lond).* 2013;10(1):20.
80. O'Leary L, Sevinc K, Papazoglou IM, Tildy B, Detillieux K, Halayko AJ, et al. Airway smooth muscle inflammation is regulated by microRNA-145 in COPD. *FEBS Lett.* 2016;590(9):1324-34.
81. Fuentes-Zacarias P, Arzate-Castaneda DA, Sosa-Gonzalez I, Villeda-Gabriel G, Morales-Mendez I, Osorio-Caballero M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induces spatio-temporal secretion of IL-1beta, TNFalpha, proMMP-9, and reduction of epithelial E-cadherin in human alveolar epithelial type II (A549) cells. *Acta Biochim Pol.* 2021.
82. Sanchez-Bautista A, Coy J, Garcia-Shimizu P, Rodriguez JC. From CLSI to EUCAST guidelines in the interpretation of antimicrobial susceptibility: What is the effect in our setting? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(4):229-32.
83. Deny M, Romano M, Denis O, Casimir G, Chamekh M. Progressive Control of *Streptococcus agalactiae*-Induced Innate Inflammatory Response Is Associated with Time Course Expression of MicroRNA-223 by Neutrophils. *Infect Immun.* 2020;88(12).
84. Khurana P, Gupta A, Sugadev R, Sharma YK, Varshney R, Ganju L, et al. nSARS-Cov-2, pulmonary edema and thrombosis: possible molecular insights using miRNA-gene circuits in regulatory networks. *ExRNA.* 2020;2(1):16.
85. Li X, Ma C, Luo H, Zhang J, Wang J, Guo H. Identification of the differential expression of genes and upstream microRNAs in small cell lung cancer compared with normal lung based on bioinformatics analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(11):e19086.
86. Tan KS, Lim RL, Liu J, Ong HH, Tan VJ, Lim HF, et al. Respiratory Viral Infections in Exacerbation of Chronic Airway Inflammatory Diseases: Novel Mechanisms and Insights From the Upper Airway Epithelium. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:99.
87. Sabry R, El Sharkawy RE, Gad NM. MiRNA -483-5p as a Potential Noninvasive Biomarker for Early Detection of Alzheimer's Disease. *Egypt J Immunol.* 2020;27(2):59-72.
88. Zhang Q, Feng Z, Shi S, Zhang Y, Ren S. Comprehensive analysis of lncRNA-associated ceRNA network reveals the novel potential of lncRNA, miRNA and mRNA biomarkers in human rectosigmoid junction cancer. *Oncol Lett.* 2021;21(2):144.
89. Lee HY, Hur J, Kang JY, Rhee CK, Lee SY. MicroRNA-21 Inhibition Suppresses Alveolar M2 Macrophages in an Ovalbumin-Induced Allergic Asthma Mice Model. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021;13(2):312-29.
90. Zhu D, Xu L, Wei X, Xia B, Gong Y, Li Q, et al. PPARgamma enhanced Adiponectin polymerization and trafficking by promoting RUVBL2 expression during adipogenic differentiation. *Gene.* 2021;764:145100.
91. Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6).

92. Korbecki J, Bobinski R, Dutka M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm Res*. 2019;68(6):443-58.
93. Du X, Wu M, Tian D, Zhou J, Wang L, Zhan L. MicroRNA-21 Contributes to Acute Liver Injury in LPS-Induced Sepsis Mice by Inhibiting PPARalpha Expression. *PPAR Res*. 2020;2020:6633022.
94. Yamakami M, Yokosawa H. Tom1 (target of Myb 1) is a novel negative regulator of interleukin-1- and tumor necrosis factor-induced signaling pathways. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(4):564-6.
95. Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H. Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem*. 2003;278(52):52865-72.
96. Li J, Yang C, Wang Y. miR126 overexpression attenuates oxygenglucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep*. 2021;23(2).
97. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34590-9.
98. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
99. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol*. 2008;180(8):5689-98.