

Análisis in silico de genes diana de miRNAs posiblemente inducidos por la infección con tuberculosis

Elba Rodríguez-Hernández ^{a*}

Laura Itzel Quintas-Granados ^b

Feliciano Milian Suazo ^c

Ana María Anaya Escalera ^a

^a Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal- INIFAP. Carretera a Colón, Ajuchitlán, Colón, Querétaro, México.

^b Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Cuauhtepc. Ciudad de México, México.

^c Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

* Autor de correspondencia: rohe577@hotmail.com

Resumen:

El objetivo fue identificar mediante análisis *in silico* los genes a los cuales se unen los miR-146a, miR-146b y miR-155 y, analizar las rutas metabólicas en las que intervienen durante la infección con tuberculosis. Para el análisis se utilizó: miRBase, UniProtKB, TargetScan Human, miRDB y miRTarBase. El miR-146a interacciona o se une a genes importantes en la adhesión celular y el proceso de fagocitosis (*CLDN16* y *ATP6VIC2*, respectivamente) (P , 0.05), esta interacción podría tener implicaciones importantes en la patogénesis de la tuberculosis o enfermedades relacionadas. Los resultados de este trabajo sugieren que la activación de mecanismos moleculares específicos en respuesta a la tuberculosis está regulada por los miR-146a, miR-146b y miR-155. Los genes con los cuales los miR-146a y miR-155 interactúan o se unen, están involucrados en la respuesta inmune y en procesos celulares imprescindibles durante una infección por tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium*, miR-146a, miR-146b, miR-155, Predicción, Diagnóstico.

Recibido: 14/05/2023

Aceptado: 19/10/2023

Introducción

La tuberculosis (TB) causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) representa un riesgo para la salud pública y una amenaza a la seguridad sanitaria; es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial⁽¹⁾. Es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones⁽²⁾. La organización mundial de la salud (OMS), reportó que en el año 2021 murieron 1.4 millones de personas, y considera que es la enfermedad más mortífera después de la COVID-19; se estima que 10.6 millones de personas se enfermaron de TB en el año 2021⁽³⁾. Es evidente que durante la pandemia causada por COVID-19, el sistema de atención, diagnóstico y tratamiento de TB fue deficiente; esto aumenta la posibilidad de un remonte de la enfermedad, con un posible impacto en la salud mundial⁽⁴⁾. En la mayoría de los casos el virus SARS-CoV-2 ocasiona una infección respiratoria en el individuo infectado, la cual se puede complicar en diferentes grados que van de leves a graves. El uso de medicamentos inmunosupresores en COVID-19 puede conducir a un aumento en la expresión génica de *Mtb*. Algunos reportes, describen casos de co-infección entre *Mtb* y SARS-CoV-2, con una prevalencia de TB entre los pacientes con COVID-19 de entre 0.47 y 4.47 %, y se reporta que la tasa de mortalidad en pacientes con TB/COVID-19 fue más alta que la de los pacientes afectados solo por uno de estos patógenos⁽⁴⁻⁶⁾.

En la práctica clínica cotidiana, el diagnóstico certero de la TB es por medio del cultivo del microorganismo, y se requieren bacterias en crecimiento para realizar pruebas de susceptibilidad a los medicamentos, lo que resulta un desafío médico importante y vuelve lento el procedimiento⁽⁷⁾. Aunado a esto, existe el problema del desarrollo progresivo de la TB farmacoresistente, lo que refuerza la necesidad urgente de investigar nuevas moléculas para diagnóstico y control de la TB⁽⁸⁾. El diagnóstico oportuno; tanto como el tratamiento eficaz de los individuos infectados, podría ayudar a reducir la TB. Por esta razón, es indispensable realizar investigación de biomarcadores novedosos para el diseño de métodos de control. En los últimos años, se ha investigado a los microRNAs como moléculas prometedoras para tales efectos, debido a su alta estabilidad, sensibilidad y especificidad⁽⁹⁾. Los miRNA son pequeños RNA reguladores no codificantes que actúan reprimiendo la expresión de proteínas a nivel postranscripcional, y tienen funciones importantes en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos⁽¹⁰⁾. Los mecanismos de regulación de los miRNAs, se basan en la complementariedad de secuencias entre el miRNA y el RNAm blanco; si la unión es perfecta resulta en la degradación del RNAm, si la unión es parcial, se reprime la traducción⁽¹¹⁾. La deadenilación del RNAm conduce a la inestabilidad y por ende la degradación del RNAm⁽¹⁰⁾. Después de cualquiera de estos mecanismos, se activa la respuesta inmune innata del huésped, con la producción de citocinas y quimiocinas⁽¹¹⁾. El desarrollo en las ciencias omicas ha permitido la rápida identificación y caracterización de pequeños RNA no codificantes, los cuales forman parte de un complejo sistema de regulación génica, y se ha encontrado una expresión diferencial de estos en individuos

infectados con TB. Durante la infección con *Mtb*, se activa la respuesta inmunitaria del huésped, en esta interacción huésped-*Mtb*, se manipula el perfil de miRNAs; esto implica la regulación de varios procesos biológicos mediados por esas moléculas⁽¹¹⁾. Algunos miRNAs que se modifican durante una infección por *Mtb*; también se producen en células inmunitarias contenidas en el granuloma y conducen a la respuesta inmunitaria adaptativa; también se pueden secretar en el medio extracelular, a través de procesos como la apoptosis o necrosis, la encapsulación dentro de microvesículas o exosomas y mediante la unión a lipoproteínas de alta densidad (HDL), entre otras. Esto permite patrones estables de expresión de miRNAs asociados a la infección por TB⁽¹²⁾.

Se sabe poco sobre la patogénesis molecular de la enfermedad, pero existen reportes recientes que demuestran la importancia de los miRNA en la TB pulmonar y que pueden ser detectados en sangre de pacientes infectados; por lo que actualmente son señalados como candidatos para el diagnóstico. Los miRNA, que son modulados en respuesta a la infección con *Mtb*, son miR-125b, miR-155, miR-144, miR-3179, miR-147, miR-146a/b, miR-886-5p, let-7e, let-7i^(13,14). La presencia y regulación de estos miRNA en humanos infectados por TB indica su importancia en la patogénesis y sobrevivencia del bacilo, por lo que es indispensable su investigación durante la infección.

El miRNA 146b ha sido asociado a la regulación de diversas vías de señalización y algunos de sus genes blanco descritos son AKT3, IL6, IRAK1, NFKB1, TLR4⁽¹⁵⁾; y se ha reportado que se sobre expresa en el suero de pacientes con TB activa⁽¹⁶⁾. El miR-155 modula la producción de mediadores inflamatorios en respuesta a estímulos microbianos regulando negativamente la expresión de TAK1 y la proteína de unión a TRAF6. También se ha observado que, en la infección por TB, miR-155 se sobre expresa e inhibe la autofagia inducida por IFN- γ ; algunos de los genes blanco a los que ha sido asociado son AKT1, APAF1, ATP6V1H, CASP3⁽¹⁵⁾. Interesantemente, miR-155 tiene doble función durante la infección con TB; por un lado, mantiene la supervivencia de los macrófagos infectados con *Mtb* y, por otro lado, promueve la supervivencia y la función de las células T específicas de *Mtb*⁽¹⁷⁾. Considerando la importancia de los miRNA en la patogénesis de la TB humana, donde se han detectado en sangre de pacientes enfermos; en este trabajo, se realizó la predicción de los genes a los que se unen los miR-146a, miR-146b y miR-155 y se realizó el análisis de las rutas metabólicas en las que estos intervienen.

Material y métodos

Selección de los miRNA de estudio

Los tres miRNA usados para el análisis, fueron seleccionados mediante una búsqueda bibliográfica en la base de datos del NCBI, a través, de la colección de revistas biomédicas

del PubMed Central (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)⁽¹⁸⁾, se seleccionaron los miRNAs estudiados en humanos, que se reportaron de manera consistente en al menos cinco revistas científicas y encontrados como sobre expresados en individuos infectados en ensayos experimentales, de estos se seleccionaron tres, al azar. Se usó la base de datos miRBase⁽¹⁹⁾ para obtener los datos de los miRNA de interés, como el número de acceso y secuencia madura de cada miRNA, mismos que fueron los siguientes: hsa-mir-146a-3p: MIMAT0004608 (CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG), hsa-miR-146b-3p: MIMAT0004766 (GCCUGUGGACUCAGUUCUGGU), hsa-miR-155-3p: MI0000681 MIMAT0004658 (CUCCUACAUAUAGCAUUAACA).

Predicción de las rutas y genes blanco de los miRNA

Para determinar los genes diana de los miRNA analizados, se usaron tres modelos ontológicos, lo que permitió obtener la metainformación más acertada a la realidad y describir la semántica de los datos más objetivos. Se usaron los siguientes programas: TargetScan Human⁽²⁰⁾, miRDB^(21,22) particularmente analizados con la herramienta target ontology⁽²³⁾ y miRTarBase^(23,24). Los criterios de inclusión de los genes blanco a estudiar fueron los siguientes. Para el software TargetScan Human⁽²⁰⁾, se incluyeron para el análisis, solo los genes con puntaje context, arriba de -0.20. En el caso de Target ontology⁽²³⁾, solo los genes blancos que cumplieron un target score arriba de 77, fueron seleccionados. Para el software miRTarBase^(23,24), se seleccionaron los genes blanco de cada miRNA de acuerdo con la evidencia experimental validada al menos por dos métodos y que estuvieran reportados en artículos relacionados al tema de estudio. Adicionalmente, los genes que se encontraron de manera consistente en al menos dos de los programas utilizados fueron los que se tomaron en cuenta para su revisión. Finalmente, de estos se seleccionaron al azar al menos dos genes blanco para revisar su relevancia en la infección con TB. A cada gen se le asignó una vía metabólica o regulatoria, usando la información de la librería de genes y genomas de Kyoto (KEGG)⁽²⁵⁾.

Resultados

Predicción de genes diana y análisis de las rutas metabólicas de los miRNAs

Los análisis bioinformáticos, permitieron predecir genes diana para los miR-146a, miR-146b y miR-155 (Cuadro 1); algunos de estos genes tienen grandes implicaciones durante la infección de TB. El miR-146a, puede regular genes involucrados en adhesión celular y procesos de formación del fagosoma (CLDN16, ATP6V1C2) (Figura 1). El miR-146b está involucrado en las rutas metabólicas de degradación de valina, leucina e isoleucina y la ruta de señalización de la hormona tiroidea entre otras (Figura 2). El miR-155 interviene en las

rutas del sistema de intercambio de azufre y el metabolismo de triptófano; de acuerdo con las predicciones del programa KEGG (enero, 2022) (Figura 3).

Los tres miRNA tienen genes diana validados en la base de datos. En el caso específico del miR-146a, sus principales rutas metabólicas KEGG son moléculas de adhesión celular y fagosoma; pero también participa en la regulación del metabolismo del cáncer, uno de los genes destacados en este proceso es *ZEB2*, que es un factor de transcripción que desempeña un papel en las vías de señalización del factor de crecimiento transformante β , que son esenciales durante el desarrollo fetal temprano y su desregulación ha sido caracterizada en diferentes tipos de cáncer⁽²⁶⁾. El software miRTarBase no muestra intersección de los miRNA en las rutas metabólicas, ya que no comparten genes diana predichos.

Cuadro 1: Predicción de las principales rutas metabólicas y genes a los que se unen e interceptan los miRNA miR-146a, miR-146b y miR-155

miRNA	Ruta metabólica KEGG	Genes blanco-destacados	Valor P
miR-146a	Moléculas de adhesión celular	CLDN16 (claudin 16)	0.02
	Fagosoma	ATP6V1C2 (ATPase H+ transporting V1 subunit C2) BCKDHB (branched chain keto acid dehydrogenase)	0.03
miR-146b	Degradación de valina, leucina e isoleucina	ABAT (4-aminobutyrate aminotransferase)	0.006
	Ruta de señalización de la hormona tiroidea	THRA (thyroid hormone receptor alpha) RXRB (retinoid X receptor beta)	0.01
miR-155	Sistema de intercambio de azufre	MOCS2 (molybdenum cofactor synthesis 2)	0.006
	Metabolismo de triptófano	IDO-1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1)	0.01

El análisis se realizó a partir de la secuencia madura -3p de cada miRNA.

Figura 2: Rutas metabólicas predichas KEGG para el miRNA 146b de acuerdo con los genes a los que se une. Panel A) Degradación de valina, leucina e isoleucina, Panel B) Ruta de señalización de la hormona tiroidea. Se resaltan (amarillo) los genes destacados en esta investigación

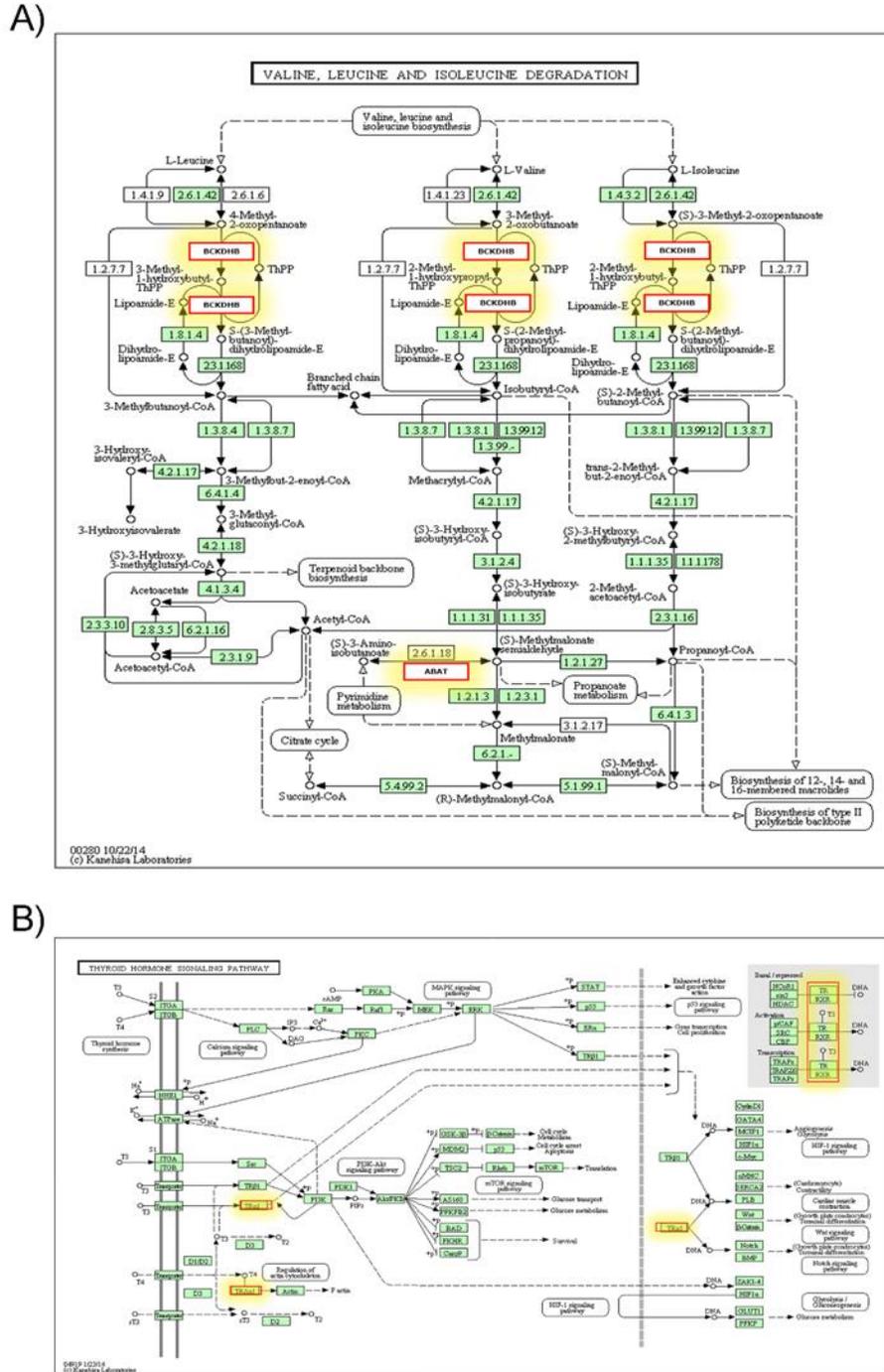
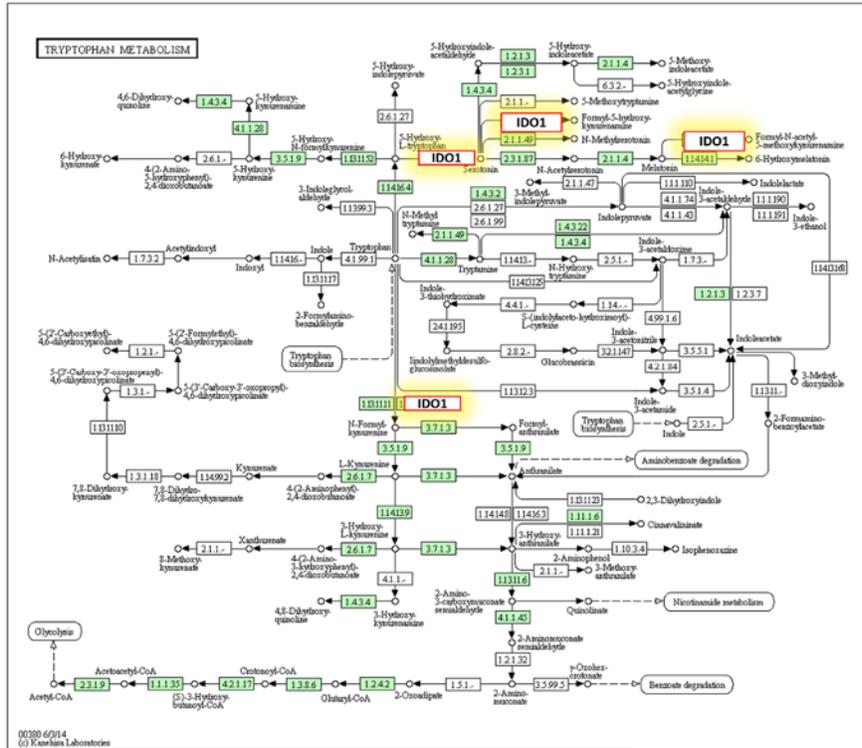
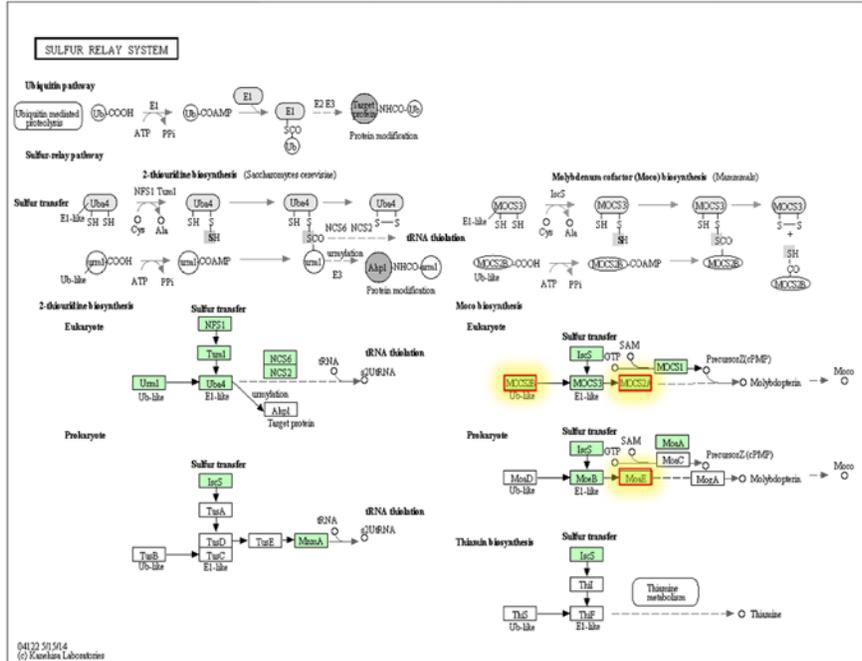


Figura 3: Rutas metabólicas predichas KEGG para el miRNA 155 de acuerdo con los genes a los que se une. Panel A) Metabolismo del triptófano, Panel B) Sistema relay de azufre. Se resaltan (amarillo) los genes destacados en esta investigación

A)



B)



Discusión

En el análisis del miR-146a se encontraron dos rutas metabólicas predichas importantes, donde hay dos genes con los que interacciona este miRNA en rutas independientes; uno de ellos es el gen *CLDN16* que codifica a la claudina 16. Las claudinas son proteínas con dominios transmembrana que se encuentran en la zona de unión estrecha entre las células de los epitelios y endotelios; junto a otras proteínas forman poros y son componentes clave del canal paracelular. Los canales paracelulares en la unión estrecha, tienen propiedades de selectividad iónica, dependencia del pH y otros efectos⁽²⁷⁾. La sobreexpresión de claudina 16 ha sido asociada a cáncer de ovario y otras enfermedades, y se ha determinado su importancia en la reabsorción de magnesio celular⁽²⁷⁾.

En un estudio se determinó el patrón de expresión de algunas claudinas (2 y 4), y se analizaron los cambios estructurales en biopsias de colon en pacientes con TB. Los resultados demuestran que la claudina 2 se expresa en la zona de unión estrecha entre las células y no se observaron cambios estructurales en el tejido analizado⁽²⁸⁾. Recientemente, se investigó el efecto de la infección por TB en la expresión de proteínas de unión celular en el sistema nervioso central (SNC). Estos resultados sugieren que Claudina-5 disminuye su expresión y cambia su localización dentro de la célula en respuesta a la infección con *Mtb* de la cepa N15, sugiriendo que *Mtb* afecta la expresión de proteínas cerebrales de las uniones celulares. Este daño, consistió en cambios celulares sugerentes de toxicidad, debido a que se observaron signos de necrosis⁽²⁹⁾.

El gen *ATP6VIC2* codifica a una enzima que es una ATPasa, algunos estudios han sugerido la importancia de las ATPasas tipo P en la fisiología y la supervivencia intracelular de las micobacterias⁽³⁰⁾. Un perfil transcripcional en humanos, de las ATPasas en condiciones de hipoxia, estrés oxidativo, inanición e intoxicación por agentes químicos y procesos de infección *in vitro* e *in vivo*, evidenció la expresión diferencial de estos transportadores frente a estas condiciones. La ATPasa es una bomba de protones altamente conservada que se expresa en las células⁽³¹⁾. Recientemente, se realizó un estudio donde se investigaron dos compuestos que inhiben el crecimiento de cepas de TB sensibles y resistentes a los medicamentos, en este estudio, a través de ensayos transcriptómicos mostraron cambios en la expresión de ciertos genes en respuesta a la infección con TB; uno de esos genes fue *ATP6VIC2* el cual se encontró sobre expresado en respuesta a la infección con TB⁽³²⁾.

El miR-146b interacciona con genes destacados que participan en la producción de energía en las células, tales como la deshidrogenasa (*BCKDHB*); y con aminotransferasa (*ABAT*) involucrada en la degradación de valina, leucina e isoleucina. Algunos reportes indican que

el aumento en la actividad del lactato deshidrogenasa sérica es un indicador de diagnóstico presuntivo de neumonía y otras infecciones como la TB⁽³³⁾.

El miR-155 demostró interacción con los genes *MOCS2* e *IDO-1*, los cuales provienen del sistema de intercambio de azufre y del metabolismo de triptófano respectivamente. El gen *MOCS2* codifica para dos proteínas diferentes *MOCS2A* y *MOCS2B*, estas dos juntas forman la enzima molibdopterina sintasa que participa en la biosíntesis del cofactor de molibdeno (MoCo), que es un grupo prostético. Las enzimas dependientes de MoCo intervienen en muchos procesos biológicos; interesantemente, el MoCo funciona directamente en las enzimas etilbenceno deshidrogenasas y otras⁽³⁴⁾. El molibdeno (Mo) es necesario para que varias enzimas como el sulfito oxidasa, el aldehído oxidasa, entre otras puedan tener su función. La función de esas enzimas es la descomposición de sustancias en el cuerpo, algunas de las cuales son tóxicas si no se metabolizan. Algunas Micobacterias tienen genes que codifican para MoCo. *Mtb* posee múltiples homólogos que codifican sintasa en la biosíntesis de MoCo; esto sugiere que su expansión puede cumplir diferentes funciones celulares⁽³⁵⁾.

Las enzimas de Mo son catalizadores en la generación de energía y reacciones de desintoxicación, entre otras funciones. Se sabe que los sustratos convertidos por las enzimas Mo bacterianas, que son importantes para la virulencia son del grupo que se generan en el huésped durante la inflamación o red de señalización. Esto sugiere que podrían ser objetivos importantes de fármacos⁽³⁶⁾. Las enzimas de Mo catalizan importantes reacciones redox. Las micobacterias tienen varias enzimas que contienen Mo; estas ayudan a regular la latencia de *Mtb*. El cofactor MoCo, es el cofactor común de las enzimas Mo en las micobacterias⁽³⁷⁾. En algunos experimentos se ha identificado una vía novedosa que usa *Mtb* para la resistencia al estrés (hipoxia) impuesto por el huésped; esta capacidad de *Mtb* de persistir en condiciones de hipoxia, contribuye a la TB latente en el huésped. *Mtb* adquirió a través de transferencia horizontal el gen *moaA1-D1*, el cual está involucrado en la biosíntesis del MoCo; a saber; estos genes tienen homólogos presentes en todo el género *Mycobacterium*; interesantemente los genes *moaA1-D1* se inducen bajo condiciones de hipoxia⁽³⁸⁾. Evolutivamente, el complejo *Mtb* ha desarrollado mecanismos para tener éxito, en parte por la adquisición de genes involucrados en la patogénesis. Descifrar y conocer los mecanismos a través de los cuales *Mtb* causa enfermedad, es relevante para identificar objetivos desconocidos y de interés para el desarrollo de nuevo métodos de control, diagnóstico y terapia de la enfermedad. El estudio amplio de la biosíntesis de las enzimas MoCo de *Mtb*, ayudará a identificar objetivos farmacológicos prometedores para controlar la TB, especialmente la TB latente.

El gen *IDO-1* codifica a una enzima que se encuentra principalmente en macrófagos, la enzima participa en la degradación del triptófano que genera quinurenina; esta ruta metabólica constituye un mecanismo de modulación de la respuesta inmune. La indolamina

2,3-dioxigenasa (IDO-1) es un enzima que se encuentra en numerosas células⁽³⁹⁾. La IDO-1 ayuda a la degradación del triptófano en quinurenina, en el interior de las células, y por tanto regula la disponibilidad del triptófano. Esto tiene amplias implicaciones en la respuesta inmune del organismo. Se ha reportado que la proteína IDO-1 se sobreexpresa en respuesta a la infección con *Mtb* en macrófagos humanos y murinos *in vitro*. La sobreexpresión de IDO-1 se ha correlacionado también, con la expresión de otros marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva y el mal pronóstico de pacientes con TB^(40,41).

Estudios *in vitro* demuestran que la actividad de IDO-1 en las células presentadoras de antígeno, inhibe la proliferación de células T específicas de antígeno micobacteriano. La actividad de IDO-1 podría tener una función importante en la inhibición de la respuesta inmunitaria adaptativa específica para *Mtb*, y podría ayudar a que el patógeno sobreviva en el huésped infectado. El metabolismo del triptófano es un medio para regular las funciones de las células T, como en la evasión del sistema inmunitario inducido por tumores, la tolerancia periférica y la inflamación durante la infección^(40,42). La activación del metabolismo del triptófano es un mecanismo antimicrobiano que se presenta contra algunas bacterias patógenas. La activación de IDO-1 y el metabolismo de triptófano en los macrófagos dentro del SNC, se relaciona con demencia asociada a el SIDA y otras enfermedades cerebrales inflamatorias⁽⁴³⁾. Intervenir la actividad de la enzima IDO-1, es una estrategia prometedora para desarrollar tratamientos en los trastornos neurológicos asociados con el VIH. En relación con la alta prevalencia de individuos infectados con VIH y *Mtb*. Así como una terapia (dirigida al huésped) efectiva contra la TB.

Si bien, este análisis se realizó en los miRNA que se han descrito en humanos, es importante destacar que el genoma de *M. bovis* tiene similitud a nivel de nucleótidos de más del 99.95 % con *M. tuberculosis*; no obstante, *M. bovis* ha perdido parte de su genoma debido a mutaciones genéticas, por mecanismos de delección; lo que lo hace más pequeño (*M. bovis* AF2122/97: 4'345,492 pb) comparado con *M. tuberculosis* (CDC1551: 4'403,836 pb)^(44,45). Interesantemente, se ha sugerido que *M. tuberculosis* surgió de *M. bovis* durante el periodo en que el ganado fue domesticado por el hombre, aproximadamente hace 10-15,000 años, al infectar al humano⁽⁴⁶⁾. Esta aseveración está fundada en la observación de la infección (causada por varias cepas de *M. bovis*) en diferentes hospederos animales incluyendo al humano; mientras que la infección natural de *M. tuberculosis*, aparentemente hasta la fecha de esta publicación, se encuentra restringida al humano⁽⁴⁷⁾. Esta similitud tan estrecha entre estas dos especies hace que el estudio de productos génicos, proteicos, así como miRNA que pueden ser análogos o equivalentes entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, sea viable para tratar de comprender un poco más de la patogénesis de la tuberculosis causada por estas dos especies, y quizá para sentar las bases para el diseño de nuevos biomarcadores o posibles blancos terapéuticos.

Conclusiones e implicaciones

Los hallazgos mostrados aquí, sugieren que los miR-146a, miR-146b y miR-155 están asociados a la activación de mecanismos moleculares específicos en respuesta a la TB. Los genes con los cuales los miR-146a y miR-155 interactúan o se unen, están involucrados en la respuesta inmune y en procesos celulares imprescindibles durante una infección por TB.

Agradecimientos

A CONAHCYT por contribuir con los fondos económicos para realizar este trabajo, con el número de proyecto 284118.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Literatura citada:

1. Cohen A, Mathiasen VD, Schön T, Wejse C. The global prevalence of latent tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2019;54(3).
2. Organization WH. Tuberculosis. Accessed Ago 15, 2023.
3. Bagcchi S. WHO's Global Tuberculosis Report 2022. *Lancet Microbe* 2023;4(1):e20.
4. Bostanghadiri N, Jazi FM, Razavi S, Fattorini L, Darban-Sarokhalil D. *Mycobacterium tuberculosis* and SARS-CoV-2 Coinfections: A Review. *Front Microbiol* 2022;12:4039.
5. Gao Y, Liu M, Chen Y, Shi S, Geng J, Tian J. Association between tuberculosis and COVID-19 severity and mortality: A rapid systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2021;93(1):194-196.
6. Proaño R, Morales N, Cajiao D. Vista de tuberculosis miliar en paciente con infección por COVID-19 (Doble Problema). *Prac Fam Rur Hosp Ecu* 2021;6(1).
7. Afsar I, Gunes M, Er H, Sener AG. Comparison of culture, microscopic smear and molecular methods in diagnosis of tuberculosis. *Rev Española Quimioter* 2018;31(5):435.
8. Ryu YJ. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms. *Tuberculosis and Respiratory Dis* 2015;78(2):64-71.

9. Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, Venkateswaran S, Manganelli R, Barzon L. Tuberculosis-associated microRNAs: from pathogenesis to disease biomarkers. *Cells* 2020;9(10):2160.
10. Iwakawa H-o, Tomari Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol* 2015;25(11):651-665.
11. Daniel EA, Sathiyamani B, Thiruvengadam K, Vivekanandan S, Vembuli H, Hanna LE. MicroRNAs as diagnostic biomarkers for Tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol* 2022;13:954396.
12. Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE, Browne JA, Gordon SV, MacHugh DE, *et al.* Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. *Front Immunol* 2017;8:118.
13. Sharbati J, Lewin A, Kutz-Lohroff B, Kamal E, Einspanier R, Sharbati S. Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis infection. *PloS one* 2011;6(5):e20258.
14. Yi Z, Fu Y, Ji R, Li R, Guan Z. Altered microRNA signatures in sputum of patients with active pulmonary tuberculosis. *PloS One* 2012;7(8):e43184.
15. Chauhan D, Davuluri KS. microRNAs associated with the pathogenesis and their role in regulating various signaling pathways during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2022:1577.
16. Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2011;49(12):4246-4251.
17. Rothchild AC, Sissons JR, Shafiani S, Plaisier C, Min D, Mai D, *et al.* MiR-155-regulated molecular network orchestrates cell fate in the innate and adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 2016;113(41):E6172-E81.
18. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, *et al.* Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* 2022;50(D1):D20.
19. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database: *MicroRNA Protocols*; 2006 [129-38]. <https://www.mirbase.org/>.
20. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 2015;4:e05005.<http://www.targetscan.org>.

21. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* 2008;14(6):101-117. <http://mirdb.org>.
22. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research* 2020;48(D1):D127-D31. <http://mirdb.org>.
23. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D155-D62. <https://mirdb.org/ontology.html>.
24. Huang HY, Lin YCD, Cui S, Huang Y, Tang Y, Xu J, *et al.* miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA–target interactions. *Nucleic Acids Res* 2022;50(D1):D222-D30. https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php.
25. Bock G, Goode JA, editors. The KEGG database. ‘In silico’ simulation of biological processes: Novartis Foundation Symposium. Wiley Online Library. 2002:247. <https://doi.org/10.1002/0470857897.ch8>.
26. Ghoumid J, Drevillon L, Alavi-Naini SM, Bondurand N, Rio M, Briand-Suleau A, *et al.* ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat–Wilson syndrome. *Hum Mol Genet* 2013;22(13):2652-2661.
27. Hou J, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(5):483.
28. Das P, Goswami P, Das TK, Nag T, Sreenivas V, Ahuja V, *et al.* Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn’s disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective. *Virchows Archiv* 2012;460(3):261-270.
29. Sánchez-Garibay C, Salinas-Lara C, Gómez-López MA, Soto-Rojas LO, Castellón-Benavides NK, Castellón-Benavides OJ, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infection induces BCSFB disruption but No BBB disruption *in vivo*: Implications in the pathophysiology of tuberculous meningitis. *Int J Mol Sci* 2022;23(12):6436.
30. López M, Quitian LV, Calderón MN, Soto CY. The P-type ATPase CtpG preferentially transports Cd²⁺ across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Arch Microbiol* 2018;200(3):483-492.
31. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H⁺-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002;297(1-2):169-77.

32. Chaudhary D, Marzuki M, Lee A, Bouzeyen R, Singh A, Gosain TP, *et al.* Disulfiram inhibits *M. tuberculosis* growth by altering methionine pool, redox status and host-immune response. *bioRxiv* 2020; <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3696891>.
33. Quist J, Hill AR. Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. *Chest* 1995;108(2):415-418.
34. Hover BM, Tonthat NK, Schumacher MA, Yokoyama K. Mechanism of pyranopterin ring formation in molybdenum cofactor biosynthesis. *PNAS* 2015;112(20):6347-6352.
35. Williams MJ, Kana BD, Mizrahi V. Functional analysis of molybdopterin biosynthesis in mycobacteria identifies a fused molybdopterin synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2011;193(1):98-106.
36. Zhong Q, Kobe B, Kappler U. Molybdenum enzymes and how they support virulence in pathogenic bacteria. *Front Microbiol* 2020;11:615860.
37. Shi T, Xie J. Molybdenum enzymes and molybdenum cofactor in mycobacteria. *J Cell Biochem* 2011;112(10):2721-2728.
38. Levillain F, Poquet Y, Mallet L, Mazères S, Marceau M, Brosch R, *et al.* Horizontal acquisition of a hypoxia-responsive molybdenum cofactor biosynthesis pathway contributed to *Mycobacterium tuberculosis* pathoadaptation. *PLoS Pathog* 2017;13(11):e1006752.
39. Suchard MS, Adu-Gyamfi CG, Cumming BM, Savulescu DM. Evolutionary views of tuberculosis: indoleamine 2, 3-dioxygenase catalyzed nicotinamide synthesis reflects shifts in macrophage metabolism: indoleamine 2, 3-dioxygenase reflects altered macrophage metabolism during tuberculosis pathogenesis. *BioEssays* 2020;42(5):1900220.
40. Blumenthal A, Nagalingam G, Huch JH, Walker L, Guillemin GJ, Smythe GA, *et al.* *M. tuberculosis* induces potent activation of IDO-1, but this is not essential for the immunological control of infection. *PloS one* 2012;7(5):e37314.
41. Gautam US, Foreman TW, Bucsan AN, Veatch AV, Alvarez X, Adekambi T, *et al.* *In vivo* inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 2018;115(1):E62-E71.
42. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 2008;222(1):206-21.
43. Davies NW, Guillemin G, Brew BJ. Tryptophan, neurodegeneration and HIV-associated neurocognitive disorder. *Int J Tryp Res* 2010;3. doi:10.4137/IJTR.S4321

44. Guta S, Casal J, Napp S, Saez JL, Garcia-Saenz A, Perez de Val B, *et al.* Epidemiological investigation of bovine tuberculosis herd breakdowns in Spain 2009/2011. *PLoS One* 2014;9(8):e104383.
45. Golby P, Nunez J, Witney A, Hinds J, Quail MA, Bentley S, *et al.* Genome-level analyses of *Mycobacterium bovis* lineages reveal the role of SNPs and antisense transcription in differential gene expression. *BMC Genom* 2013;14(1):1-18.
46. Diamond J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 2002;418(6898):700-707.
47. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2002;186(1):74-80.