



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**REGULACIÓN DE IL-10 POR microRNAs EN
MONOCITOS DE CERDO EN RESPUESTA A
*Bifidobacterium animalis ssp lactis Bb12***

POR:

MARINA ARENAS PADILLA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACION DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Marina Arenas Padilla, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis



Dr. Jesús Hernández López
Asesor



Dra. Ana María Calderón de la Barca
Asesora



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), a la Coordinación de Ciencia de los Alimentos por aceptarme y permitirme realizar este proyecto, así como al personal de Docencia por todo el apoyo brindado.

Al Fondo para la Investigación Científica Básica de CONACyT proyecto 257462, por los recursos financieros otorgados a la presente investigación.

A mi directora de tesis la Dra. Verónica Mata Haro. Gracias por todo el apoyo que me ha brindado desde la maestría, por brindarme siempre su ayuda, apoyo y consejo.

A los miembros de mi comité, Dra. Ana María Calderón, Dr. Adrián Hernández y Dr. Jesús Hernández; gracias por compartir su tiempo y disponibilidad, por todo el apoyo recibido en este trayecto.

Gracias al Dr. Juan José Garrido de la Universidad de Córdoba, España, por haberme recibido en su laboratorio. A los Doctores Saray Juber, a Carmen, Nati y los demás compañeros, gracias por las enseñanzas y principalmente por hacerme sentir en casa durante mi estancia.

Gracias a todas las personas del CIAD (Doctores, Maestros, compañeros) que en algún momento me dieron ánimos y palabras inspiradoras para seguir adelante.

A la M. C. Leticia Félix, gracias por sus palabras, enseñanzas y apoyo, tanto en lo personal, así como en el laboratorio. Gracias por tu amistad, por las pláticas, risas, gustos, disgustos, comedera, etc.

A mis amigos, Claudia, Anna, Melvin, gracias por brindarme su amistad, otra cosa buena que me dio el CIAD! Gracias por todos los momentos que pasamos desde el inicio (cuando eramos jóvenes). Melvincito iniciamos esto juntos y se nos fue el tiempo volando, gracias por nuestras pláticas en el domo. Vecina y Claudia gracias por ser mis amigas poco comunes, por apoyarme en los momentos difíciles y alegrarme con lo tontas que son. Vecina, creo que no es necesario escribir mucho, gracias por tu amistad-vecindad, gracias por alentarme, regañarme, alimentarme y apoyarme siempre.

A Rocío “mi Coma”, siempre te agradeceré por haberme motivado a entrar al mundo CIAD.

A mis papás, por ser un ejemplo de vida y una motivación a seguir adelante, por siempre apoyarme y estar para mí.

A mi tía Olivia, que siempre creyó en mí.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCION	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. IL-10	15
2.2. Bacterias Benéficas	16
2.3. Receptores Tipo Toll	18
2.3.1. Descripción	18
2.3.2. Señalización TLR2	19
2.4. MicroRNAs	21
2.4.1. Historia	21
2.4.2. Biogénesis y Procesamiento	22
2.4.3. Regulación Génica por MiRNAs	24
2.4.4. MiRNAs en Respuesta a Microorganismos	24
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo General	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1. Preparación de Bacterias	29
5.2. Obtención de Sangre Periférica	29
5.3. Obtención de Monocitos	30
5.4. Estimulación de Monocitos con Bacterias	30
5.5. Análisis de la Expresión de Genes y MiRNAs	31
5.5.1. Análisis de la Expresión de Genes	31
5.5.2. Análisis de la Expresión de MiRNAs	32
5.5.2.1. Expresión de miRNAs por microarreglo	32
5.5.2.2. Expresión de miRNAs por RT-qPCR	32
5.6. Predicción de MiRNAs y Proteínas Blanco	33

CONTENIDO (continuación)

5.7. Análisis Estadístico	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1. Participación de TLR2 en la Producción de IL-10 en Monocitos de Cerdo	34
6.2. Predicciones <i>In silico</i> de MiRNAs Involucrados en la Regulación del Transcrito de IL-10	38
6.3. Expresión de MiRNAs en Monocitos de Cerdo Estimulados con Bb12 .	41
6.3.1. Análisis de la Expresión de MiRNAs por Microarreglo	41
6.3.2. Análisis de la Expresión de MiRNAs por RT-qPCR	47
6.4. Determinación de Proteínas Blanco Participantes en la Vía TLR2/IL-10 por MiRNAs en Respuesta a Bb12	48
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reconocimiento de estructuras microbianas por TLR.....	19
2	Biogénesis y procesamiento de miRNAs.....	23
3	Expresión relativa de IL-10 por RT-qPCR en monocitos estimulados con Bb12 a distintas concentraciones de anti-TLR2.....	34
4	Expresión relativa de IL-10 por RT-qPCR en monocitos estimulados con Bb12.....	35
5	Expresión relativa de IL-10 por RT-qPCR en monocitos estimulados con sobrenadante de Bb12.....	36
6	Expresión relativa de NF- κ B por RT-qPCR en monocitos estimulados con Bb12.....	37
7	Imagen ilustrativa del análisis de alineación de secuencias en TargetScan 7.1.....	39
8	Diagrama de organización y selección de miRNAs analizados en el microarreglo.....	42
9	Validación de la expresión de miRNAs con blanco en IL-10 por RT-qPCR.....	47
10	Mecanismo propuesto de la regulación de IL-10 por miRNAs en respuesta a Bb12.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas para el análisis de la expresión de genes.....	32
2	Secuencias de iniciadores utilizados para el análisis de la expresión de miRNAs.....	33
3	Predicción de MiRNAs conservados entre vertebrados y mamíferos con blanco en IL-10 obtenidos por TargetScan 7.1.....	40
4	Selección de miRNAs de referencia.....	43
5	MFI de miRNAs diferencialmente expresados por efecto de los tratamientos.....	44
6	Cambios en la expresión de miRNAs correlacionados con TLR2....	46

RESUMEN

El balance entre la respuesta inmune inflamatoria y la anti-inflamatoria es primordial para mantener la homeostasis intestinal, que se puede afectar por diversos factores como cambios en la dieta, infecciones y uso de antibióticos. Una alternativa para restablecer el equilibrio, son los probióticos, con múltiples beneficios de prevención y mejoras en la salud del hospedero. En particular, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 (Bb12), es una bacteria probiótica utilizada desde 1985 como ingrediente de suplementos alimentarios, que mejora la función intestinal y modula la respuesta inmunitaria a través de la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10. La modulación del sistema inmune por bifidobacterias se da en parte por su interacción con el receptor TLR2 de células del sistema inmune. Dicha activación conlleva a la expresión de microRNAs (miRNAs), los cuales desempeñan un papel primordial en la regulación de proteínas en distintos procesos celulares, incluyendo la producción de IL-10. El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de TLR2 en la regulación de IL-10. Para lo cual se analizó la expresión de miRNAs en monocitos de cerdo en respuesta a Bb12 mediante un microarreglo. Se realizó un bloqueo del receptor TLR2 utilizando un anticuerpo monoclonal y se comparó la expresión de monocitos estimulados con Bb12 con y sin bloqueo del receptor. De 407 miRNAs analizados, los cambios en la expresión de 46 miRNAs están relacionados con la activación de TLR2. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se integró la información obtenida con las bases de datos de interacciones validadas entre miRNAs y RNA mensajero de proteínas de la vía TLR2/IL-10. Se encontró que miembros de la familia let-7-5p y miR-27b-3p, tienen influencia en la regulación directa del transcrito de IL-10; mientras que miR-146b-5p y miR-155-5p, podrían estar regulando la expresión de la citocina a nivel señalización.

Palabras clave: miRNAs, IL-10, TLR2, *Bifidobacterium*

ABSTRACT

The balance between the inflammatory and the anti-inflammatory immune response is key to maintain intestinal homeostasis, and this can be affected by several factors, like changes in diet, infections and antibiotic usage. Probiotics are an alternative to restore the lost balance, offering several protective benefits and health improvements in the host. In particular, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 (Bb12), a probiotic bacteria used since 1985 as supplement in our diets because of its benefits, since it is able to influence the intestinal function and modulate immune responses through the production of anti-inflammatory cytokines, as IL-10. Immunomodulation by bifidobacteria is partly given by their interaction with the TLR2 receptor of immune system cells. This activation leads to the expression of microRNAs (miRNAs), which have a main role in protein regulation involved in several cellular processes, including IL-10 production. The aim of this work was to evaluate the role of TLR2 in IL-10 regulation. The miRNA expression was analyzed in swine monocytes in response to Bb12 with a microarray. Blockage of TLR2 was achieved using a monoclonal antibody and was compared to basal expression in monocytes stimulated with Bb12 with and without receptor blockage. The expression pattern of 407 miRNAs was analyzed, and changes of 46 of them were related to TLR2 activation. By using bioinformatic tools, the obtained information was integrated with the database of valid interactions within miRNA and messenger RNA of key proteins from the TLR2/IL-10 pathway. It was found that members of let-7-5p and miR-27b-3p have influence in the direct regulation of the IL-10 transcript, while miR-146b-5p and miR-155-5p could regulate this same cytokine expression on a signaling level.

Key words: miRNAs, IL-10, TLR2, *Bifidobacterium*

1. INTRODUCCION

La excesiva producción de citocinas pro-inflamatorias resulta en daño tisular lo cual es perjudicial para el hospedero. Por esto, el mantenimiento de la homeostasis inmunológica es primordial para limitar la activación celular, la producción de citocinas y por ende el daño al tejido. En este contexto, la producción de interleucina 10 (IL-10) es elemental para el mantenimiento de la homeostasis, ya que es una potente citocina anti-inflamatoria que limita la producción de las pro-inflamatorias. La IL-10 inhibe múltiples funciones fagocíticas y efectoras de células dendríticas (DC) y juega un papel crítico en la limitación de la lesión tisular durante infecciones. Así mismo, interviene en la prevención de autoinmunidad al limitar la duración e intensidad de las reacciones inmunes e inflamatorias.

Los microorganismos probióticos han sido ampliamente estudiados debido a los beneficios a la salud al administrarse en la dieta tanto en humanos como animales. Los probióticos mejoran la función de la barrera o protección intestinal en enfermedades de inflamación crónica, aportan beneficios en el tratamiento de alergias e incluso pueden participar en la reducción de tumores. Muchos de estos beneficios se deben a su capacidad de modular el sistema inmunológico. Específicamente, *Bifidobacterium animalis ssp lactis* Bb12 (Bb12), fue uno de los primeros microorganismos descrito como probiótico. Éste, ha demostrado mejorar la función intestinal, proteger contra diarreas y reducir los efectos colaterales del tratamiento con antibióticos, además de inducir la producción de IL-10, en células del sistema inmune.

La respuesta inmune comienza cuando las células responden a un estímulo, como es la interacción con bacterias. Los receptores tipo Toll (TLR) se activan por medio del reconocimiento de estructuras microbianas, que conduce al inicio de la cascada de señalización celular para la inducción de elementos de respuesta; como la expresión de moléculas de membrana, factores de transcripción y proteínas de respuesta como quimiocinas y citocinas. Las vías de señalización inducidas por TLR deben estar finamente reguladas, ya que alteraciones en la señalización puede impactar a la función celular y con ello el inicio de respuestas inmunológicas inadecuadas. Aunque hay

diferentes mecanismos de regulación génica; en los últimos años, uno muy estudiado es la regulación de proteínas por microRNAs (miRNAs). Se ha demostrado que los miRNAs se encuentran involucrados en la regulación de la respuesta inmunológica y en la respuesta a bacterias probióticas o con potencial probiótico.

En este trabajo de investigación, se estudió la regulación de IL-10 por miRNAs y la participación del receptor TLR2 en este proceso, para de esta manera profundizar en los mecanismos de regulación de esta citocina en la respuesta inmunológica a probióticos.

2. ANTECEDENTES

El sistema inmune tiene la función de responder ante agentes extraños para mantener el correcto funcionamiento del organismo. La respuesta pro-inflamatoria es necesaria para la eliminación de patógenos; sin embargo, una respuesta inmune exacerbada puede provocar daño en tejido, patologías de inflamación crónica o incluso favorecer el desarrollo de enfermedades autoinmunes. La respuesta pro-inflamatoria está asociada con un incremento en la expresión de factores de transcripción, proteínas de respuesta y citocinas. De la misma manera, una respuesta deficiente o un estado anti-inflamatorio puede llevar al organismo a la inmunosupresión (Hawrylowicz y O'Garra, 2005; Moore et al., 2001; O'Garra et al., 2008). El balance entre la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria es crucial para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, en donde IL-10 es un elemento clave para mantener este balance (Saraiva y O'Garra, 2010).

2.1. IL-10

IL-10 es una citocina generalmente de tipo supresivo, producida por las distintas células del sistema inmune como: DC, macrófagos, mastocitos, células asesinas naturales, eosinófilos y neutrófilos. Inicialmente se describió como una citocina de tipo cooperador humoral o Th2 (Fiorentino et al., 1989); sin embargo, más adelante la evidencia indicaba que la producción de IL-10 estaba además asociada con la respuesta T reguladora o con tolerancia inmunológica (Moore et al., 2001; O'Garra y Vieira, 2004; Grazia Roncarolo et al., 2006). El gen de IL-10 se ha identificado como un locus de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), una de las causas más comunes de inflamación intestinal no-infecciosa en humanos (Franke et al., 2008). IL-10 es una citocina con efectos importantes en el desarrollo de la respuesta inmune. Una de las vías de señalización que inicia la producción de IL-10 se da mediante el reconocimiento por

TLR (MyD88-dependiente), seguido de la activación de la vía de las proteínas activadas por mitógenos (MAPKs o MAP cinasas) y del factor nuclear kappa B (NF-κB) (Akira y Takeda, 2004). IL-10 en macrófagos inhibe aproximadamente el 20% de genes pro-inflamatorios inducidos por lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas (Lang et al., 2002).

Para que IL-10 ejerza su efecto anti-inflamatorio debe unirse a su receptor (IL-10R), el cual está compuesto por las subunidades IL-10R1 e IL-10R2. La subunidad IL-10R2 se expresa de manera general, mientras que IL-10R1 se restringe a leucocitos y órganos linfoides, particularmente con altos niveles en monocitos y macrófagos. Al unirse IL-10 con IL-10R, se activa la señalización IL-10/JAK1/STAT3. Cuando STAT3 se transloca al núcleo, se induce la expresión de elementos implicados en la respuesta anti-inflamatoria, como proteínas inhibitoras de NF-κB y de citocinas pro-inflamatorias, como TNF-α e IL-12b (Hutchins et al., 2013).

Entender la regulación de la expresión de IL-10, tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta adaptativa, es de gran relevancia en la investigación. Esto con el fin de desarrollar estrategias para el tratamiento de patologías que involucran trastornos en la respuesta inmune. La regulación de IL-10 se puede dar por cambios en la estructura de la cromatina del locus de IL-10, el incremento o disminución de la transcripción de IL-10, incluyendo la regulación de las vías de señalización y además la regulación post-transcripcional.

2.2. Bacterias Benéficas

Existe gran cantidad de microorganismos en el planeta, y la mayoría de estos no son dañinos para la salud, de hecho, los patógenos constituyen mucho menos del 1%. A nivel humano, se calcula que la microbiota intestinal que constituye el sistema digestivo tiene un peso aproximado de 1 kg y contiene más de 400 especies distintas de microorganismos. Algunos de ellos, principalmente las bifidobacterias y los lactobacilos, realizan funciones que benefician al hospedero.

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a los probióticos como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedero” (Hill et al., 2014). Para que una bacteria sea calificada como probiótico debe cumplir con algunos criterios. Entre ellos, ser habitante normal del tracto gastrointestinal, no ser patógeno o tóxico para el hospedero, tener un tiempo corto de reproducción. Así mismo, ser estable ante el contacto con bilis, ácido, enzimas y oxígeno; tener capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, capacidad de colonización del tracto y de producir sustancias antimicrobianas (Kailasapathy y Chin, 2000).

La definición de probiótico indica que son organismos vivos que confieren beneficios a su hospedero y hay múltiples estudios que respaldan este concepto. Hay evidencia científica de que estos microorganismos aún inactivados tienen efectos benéficos en la salud (Kataria et al., 2009). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Bifidobacterium breve* Bb1 y Bb2 al ser inactivados con radiación ultravioleta, incrementan la producción de citocinas en células mononucleares de sangre periférica de manera similar a la estimulación con bacterias vivas. Distintos compuestos aislados de bacterias pueden inducir respuestas inmunes específicas. Estas investigaciones proveen las bases para explicar los efectos inmunológicos tras la administración de probióticos vivos, inactivados o sus fragmentos.

En particular, se ha estudiado ampliamente la inducción de la producción de IL-10 por acción de probióticos, ya que el balance entre IL-10 y citocinas pro-inflamatorias que es secretado por macrófagos y DC en respuesta a microorganismos es crucial para la determinación de la respuesta inmune (Kaji et al., 2010). El perfil de citocinas inducido sobre las células por acción de probióticos es cepa específico, es decir, que depende del género, especie, cepa e incluso la concentración de bacterias administradas ya sea *in vivo* o *in vitro* (Borchers et al., 2009).

El género *Bifidobacterium* comprende una gran variedad de especies, donde algunas han sido clasificadas como probióticos. Entre las características generales de las bacterias pertenecientes a este género, se encuentra que son anaeróbicas, no producen gas, son Gram-positivas y habitan en mayor medida en el tracto gastrointestinal en humanos y animales (Ouwehand et al., 2002).

En los últimos años se ha estudiado ampliamente la relación de la microbiota con su hospedero. La comunicación entre ambos inicia principalmente con la interacción entre las células epiteliales y las células presentadoras de antígeno (APC) del hospedero con los microorganismos. Las APC se encargan de detectar en el ambiente patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs). Éstos, son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en las células inmunitarias como monocitos, macrófagos, neutrófilos y DC (Lebeer et al., 2010).

Así mismo, cuando se da el reconocimiento de estructuras existentes en la pared celular de las bacterias benéficas administradas, son reconocidas por las células del sistema inmune mediante receptores celulares especializados de la membrana celular, como los TLR.

2.3. Receptores Tipo Toll

2.3.1. Descripción

Los Receptores Tipo Toll o TLR por sus siglas en inglés, son proteínas transmembranales presentes en células del sistema inmune innato, los cuales reconocen estructuras microbianas iniciando vías de señalización para activar la respuesta inmunológica. Los TLR fueron identificados por primera vez en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). La familia TLR en humanos está conformada por 10 proteínas (TLR1-TLR10), en ratones TLR10 no es funcional y además se han identificado los receptores TLR11, TLR12 y TLR13. Los TLR en mamíferos contienen una porción extracelular rica en leucina, una región transmembranal y un dominio citoplasmático llamado receptor de interleucina 1 (TIR) (Kawai y Akira, 2010).

En humanos, TLR1, 2, 4, 5 y 6 están asociados a la membrana celular y responden principalmente a MAMPs de bacterias. Por su parte, TLR3, 7, 8 y 9 se encuentran en la

superficie de endosomas y responden principalmente a los ácidos nucleicos de virus y bacterias (Figura 1) (Takeda y Akira, 2004).

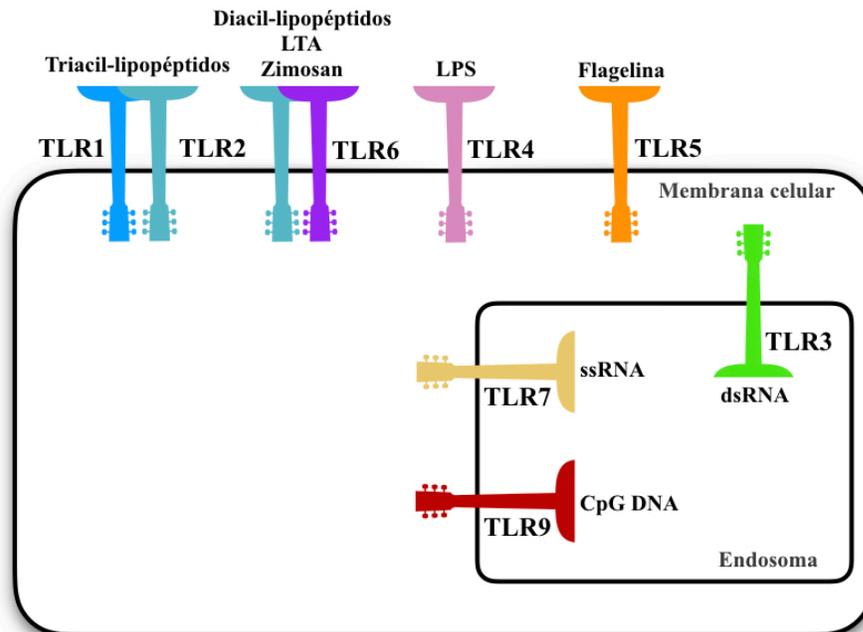


Figura 1. Reconocimiento de estructuras microbianas por TLR (modificada de Takeda y Akira, 2004). LTA: Ácido Lipoteicoico; LPS: Lipopolisacárido; ssRNA: RNA de cadena sencilla; dsRNA: RNA de cadena doble; CpG DNA: Patrones de secuencias CpG de DNA.

2.3.2. Señalización TLR2

El receptor TLR2 identifica peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicoico (LTA) y lipoproteínas bacterianas (BLP), estructuras constitutivas de los probióticos. TLR2 forma dímeros con TLR1 y TLR6, esta heterodimerización expande su espectro de reconocimiento, pero no conlleva a una señalización diferencial. Por lo tanto, la diferencia debe radicar en las moléculas que componen la cascada de señalización.

Las vías de señalización inician cuando los ligandos de TLR han sido reconocidos en la superficie celular o en endosomas, lo que da lugar a la dimerización de las proteínas que lo componen. Este proceso va seguido por la recolección de proteínas adaptadoras que

contienen el dominio TIR, con el objetivo de facilitar la captación de diversas proteínas cinasas, lo que culmina en la activación de distintos factores de transcripción (Abbas et al., 2014).

Hay dos vías de señalización asociadas con TLR: la que requiere la proteína adaptadora MyD88 y la vía MyD88-independiente. Todos los TLR a excepción de TLR3, señalizan por la vía dependiente de MyD88, lo que conlleva a la activación del factor de transcripción NF- κ B, induciendo la producción de citocinas. MyD88 tiene un dominio TIR que se une al dominio TIR en el receptor activado. Al unirse al TLR, MyD88 recluta proteínas de la familia de cinasas asociadas a IL-1R (IRAK). Las proteínas IRAK interactúan con la proteína asociada al factor de necrosis tumoral (TRAF6), permitiendo que active a la cinasa del factor de crecimiento transformante beta (TAK1). TAK1 fosforila el complejo de cinasas del inhibidor de kappa B (IKK), activándolo. El complejo IKK activado destruye el inhibidor de NF- κ B (I κ B) dejando a NF- κ B libre para entrar en el núcleo y aumentar la transcripción de ciertos genes (Akida y Takeda, 2004). También, TAK1 puede estimular la vía AP-1 (proteína activadora 1) mediante activación de la vía de MAP cinasas.

Se ha sugerido que los agonistas del receptor TLR2 están especializados en la inducción de la expresión de IL-10 en APC (Agrawal et al., 2003; Dillon et al., 2004; Hu et al., 2006; Netea et al., 2004). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, son varias las proteínas que intervienen en la señalización, además de que son proteínas no exclusivas de una sola vía. Por esto, la producción de IL-10 vía TLR2 puede estar regulada en distintos puntos. En este mecanismo de regulación clave para la homeostasis inmunológica se ve implicada la participación de microRNAs.

2.4. MicroRNAs

Las células eucariotas disponen de un repertorio variado de transcritos pequeños no codificantes denominados microRNA o miRNAs, tienen una longitud de aproximadamente 16-27 nucleótidos (Guo et al., 2013). Su papel es regular la expresión génica en procesos celulares como diferenciación, desarrollo y proliferación, entre muchos otros (Li y Kowdley, 2012). Esta regulación la llevan a cabo mediante el apareamiento imperfecto a RNA mensajero (mRNA) de proteínas. La región “seed” (2-7 nucleótidos del extremo 5’) de los miRNA se unen a la región 3’ UTR del mRNA de sus proteínas blanco (Bartel, 2009); un solo miRNA puede tener cientos de proteínas blanco (Peter, 2010). Es por esta razón que regulan la mayoría de las vías de señalización celular. Para ejercer su función, los miRNAs pueden bloquear el inicio de la traducción, reprimirla una vez iniciada, o también desestabilizar el mRNA mediante una deadenilación (Kishore et al., 1999; Knödler et al., 2009).

2.4.1. Historia

Lee y colaboradores (1993) revelaron que el gen *lin-4* transcribía un RNA de 22 nucleótidos de longitud que inhibe a *lin-14* por interferencia de RNA en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Los autores concluyeron que *lin-4* podría pertenecer a una clase de RNA pequeño, no traducible y con función reguladora, aunque durante años no hubo más evidencia acerca de *lin-4* en *C. elegans* u otros organismos. Posteriormente se identificó un segundo RNA pequeño, *let-7* en *C. elegans* (Reinhart et al., 2000), y se descubrieron otros RNA pequeños de 22 nucleótidos (Ambros et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2001; Lee y Ambros, 2001), lo que llevó a su reconocimiento como microRNAs. En 2006, se estableció miRBase (<http://www.mirbase.org>), una base de datos que proporciona la nomenclatura y las secuencias de miRNAs (Griffiths-Jones et al., 2007).

2.4.2. Biogénesis y Procesamiento

La biogénesis de miRNAs está estrictamente regulada, lo que da como resultado patrones de expresión de miRNAs característicos para diferentes organismos, tejidos, tipos de células y etapas de desarrollo (Slezak-Prochazka et al., 2010).

En la Figura 2 se ilustra la biogénesis de los miRNA, la cual comienza con la síntesis de un transcrito policistrónico que se fragmenta para la generación de múltiples secuencias o miRNAs maduros. Los genes que codifican a los miRNAs se encuentran localizados en exones e intrones de genes de mRNA (Rodríguez et al., 2004; Ying y Lin, 2006).

Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II para generar moléculas precursoras o pri-miRNA, el cual tiene una estructura de bucle y tallo largo de aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Los pri-miRNA son procesados en el núcleo por el complejo “microprocesador”, que consiste en la enzima RNasa III Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena (DGCR8), esto con el fin de generar un precursor más pequeño (≈ 60 nucleótidos) conocido como pre-miRNA (Han et al., 2004). Los pre-miRNAs son transportados al citoplasma por medio del complejo proteico formado por el factor nuclear de exportación Exportina 5 (Exp5) y la proteína de unión a GTP Ran (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003).

Una vez en el citoplasma los pre-miRNAs son reconocidos y procesados por la endonucleasa Dicer junto con la proteína de unión de RNA de doble cadena (TRBP), esto genera un RNA dúplex formado por una cadena de miRNA maduro y una cadena miRNA complementaria (miRNA/miRNA^{*}), de aproximadamente 22 nucleótidos. El dúplex generado es transportado por la proteína Argonauta (AGO), donde la cadena de miRNA maduro es seleccionada para actuar como cadena guía. Después de la escisión de Dicer, se pueden generar una cadena 5p y una cadena 3p, la cadena más estable será funcional y la cadena menos estable se degradará. En algunos casos, ambas hebras pueden ser funcionales (Han et al., 2015; Pink et al., 2015). La estabilidad del miRNA maduro puede influir en su función y capacidad de entrar al complejo silenciador inducido por miRNA (miRISC). AGO se sitúa en el centro del miRISC, este complejo proteico está constituido por Dicer, la proteína de unión a RNA; TRBP y principalmente por las proteínas AGO

(Ma et al., 2009). A pesar de que Dicer es una enzima fundamental en el procesamiento de los miRNAs, se ha identificado una ruta de biogénesis de miRNA independiente de Dicer que utiliza la actividad catalítica de corte de la proteína Argonauta-2 (AGO2) (Cifuentes et al., 2010).

La función del miRISC es ser guía para identificar los mRNA blanco, con el fin de bloquear la síntesis proteica. Hay una discusión en curso acerca de cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión, es decir, si existe una represión en la traducción y si esta precede a la degradación del mensaje (Hu y Coller, 2012). Sin embargo, varias publicaciones apoyan la noción de que la represión transduccional es el evento inicial, seguido por la degradación del mRNA (Bazzini et al., 2012; Djuranovic et al., 2012; Guo et al., 2010).

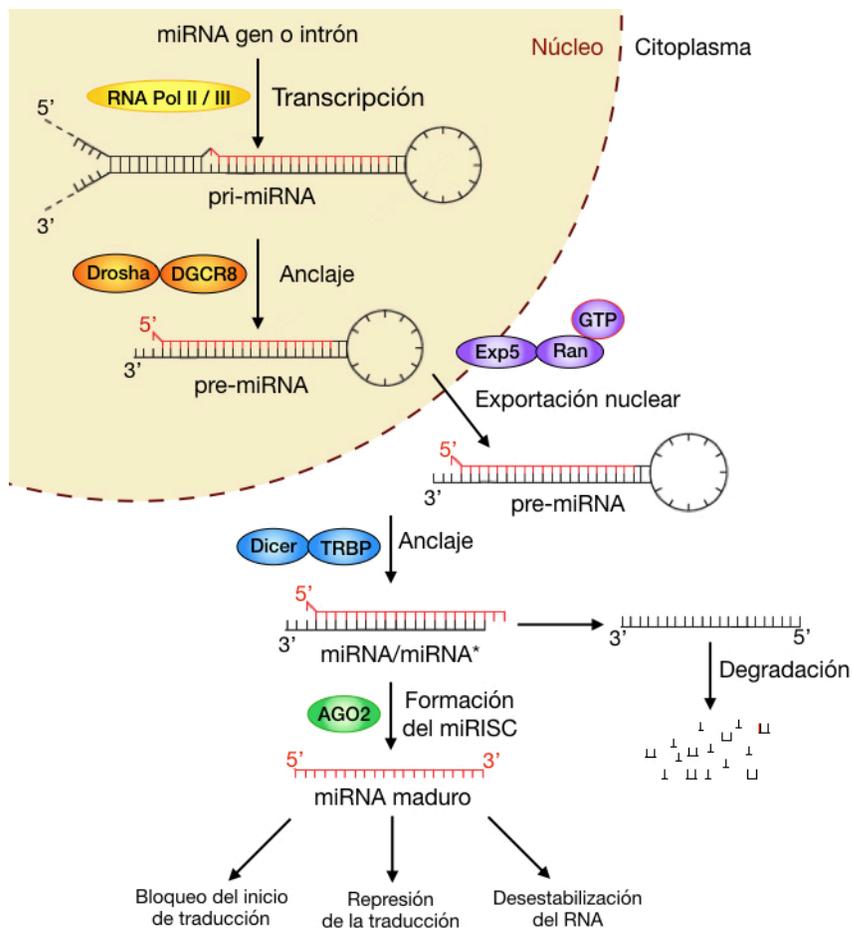


Figura 2. Biogénesis y procesamiento de miRNAs (traducida de Winter et al., 2009).

2.4.3. Regulación Génica por MiRNAs

El mecanismo de regulación por miRNAs consiste en la unión imperfecta del miRNA con su mRNA blanco. Generalmente, los miRNAs ejercen su función mediante el apareamiento de su región “seed” a la región 3’UTR (región no codificante) del mRNA de proteínas (Chu y Rana, 2007). La inhibición de la expresión génica es el mecanismo predominante, sin embargo, hay informes sobre la estimulación de genes inducida por miRNAs (Lee y Vasudevan, 2013; Ritchie et al., 2009b; Vasudevan et al., 2007).

Para poder ejercer su función reguladora, los miRNAs deben estar unidos por proteínas AGO (Meister, 2013). En humanos existen cuatro proteínas AGO distintas, siendo AGO2 la más abundante (Wang et al., 2012). Además, AGO2 es único entre los demás con función catalítica de corte, lo que permite la segmentación de sitios blanco de miRNAs con alta complementariedad (Ameres y Zamore, 2013).

Un factor particularmente importante que estabiliza las interacciones miRNA-mRNA, radica en la complementariedad de las bases del mRNA blanco con el extremo 5' (posición 2 a 7) del miRNA, la región “seed”. Además de la secuencia destino en el transcrito, la región “seed” de los miRNAs es fundamental en la predicción computacional de interacciones miRNA-mRNA, ya que el solo emparejamiento de bases entre la región “seed” con su blanco, es a menudo funcionalmente suficiente (Bartel, 2009).

2.4.4. MiRNAs en Respuesta a Microorganismos

La activación de la respuesta inmune se encuentra entre los ejemplos mejor estudiados de respuestas celulares a estímulos externos. Esta respuesta se caracteriza por cambios en la expresión génica que requieren regulación precisa para establecer una respuesta inmunológica apropiada (Gat-Viks et al., 2013; Liu y Cao, 2015), asegurando así la máxima protección contra infecciones mientras se evita el daño tisular. Los miRNAs tienen un papel crucial ya que regulan el desarrollo y la función de las células inmunes y

puede tener efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios (Garo y Murugaiyan, 2016; O'Connell et al., 2012). Los datos experimentales indican que el repertorio de miRNAs de las células huésped se altera en respuesta a infecciones microbianas (Eulalio et al., 2012). Además, si estos se expresaran de manera aberrante, pueden contribuir a condiciones patológicas relacionadas con la inmunidad, como enfermedades infecciosas o inflamatorias, autoinmunidad o cáncer (Staff, 2015). Como parte de esta tesis doctoral, se redactó un artículo de revisión que aborda las investigaciones recientes sobre las implicaciones de los miRNAs en enfermedades inflamatorias: **“Regulation of TLR signaling pathways by microRNAs: implications in inflammatory diseases”**. Dicho artículo está en prensa en la revista Central European Journal of Immunology (Arenas-Padilla y Mata-Haro, 2018).

Se han encontrado varios miRNAs implicados en la regulación de la respuesta inmunológica. En trabajos previos, se ha observado un incremento en la expresión de miR-147, miR-21 y miR-9 en respuesta a ligandos de TLR y a citocinas pro-inflamatorias, en DC y macrófagos (Taganov et al., 2006; Bazzoni et al., 2009). En macrófagos derivados de médula ósea, se indujo la expresión de miR-155 en respuesta a varios ligandos de TLR (O'Connell et al., 2007). En otro estudio, se demostró que durante una infección intracelular con *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin, disminuye la expresión de miR-29, por lo que se eleva la producción de IFN- γ (Feng et al., 2011). Además, los tratamientos con *Lactobacillus* producen cambios en la expresión de miRNAs del hospedero, como miR-200b, miR-215 y miR-192, los cuales son inhibidos durante una infección con *L. monocytogenes* (Archambaud et al., 2012). Xue et al. (2011), observaron en un experimento *in vivo* en ratones, que la microbiota inhibe la expresión de miR-10a el cual utiliza como blanco el mRNA de IL-12. Algunos miRNAs han sido llamados “inmunomiRs” por algunos autores, por estar principalmente implicados en la regulación de proteínas de diferenciación de células del sistema inmune y su respuesta (Asirvatham et al., 2008). Destacan miR-146a y miR-155, por regular proteínas de importancia en la señalización de las vías de TLR. Estos miRNAs también están implicados en la respuesta a probióticos vía TLR2/NF- κ B (González-Rascón y Mata-Haro, 2015).

Es evidente que los miRNAs juegan un papel crucial en los procesos celulares, que requieren de una regulación estricta, como la respuesta inmune. Existe gran variedad de

información sobre los miRNAs y su acción determinante en la regulación de genes de la señalización de TLR, de citocinas y en respuesta a bacterias benéficas.

En particular, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 (Bb12), ha demostrado ser capaz de mejorar la función intestinal y modular la respuesta inmunitaria a través de su interacción con el receptor TLR2 de células del sistema inmune. Dicha interacción conlleva a la expresión de miRNAs, los cuales desempeñan en la producción de IL-10. Sin embargo, aún se requiere generar información que permita esclarecer el papel de los probióticos en los mecanismos de señalización en células innatas a través de la modulación de la expresión de miRNAs.

3. HIPÓTESIS

La activación de TLR2 en monocitos de cerdo por *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12, induce la expresión diferencial de microRNAs capaces de regular IL-10.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la regulación de IL-10 por miRNAs en monocitos de cerdo estimulados con *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb12.

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar el papel de TLR2 sobre la producción de IL-10 en monocitos de cerdo estimuladas con *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb12.
2. Analizar *in silico* los microRNAs implicados en la regulación de IL-10 en monocitos de cerdo estimulados con *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb12.
3. Analizar la expresión de microRNAs en monocitos de cerdo estimulados con *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb12, mediante un microarreglo.
4. Identificar los miRNAs relacionados con la vía TLR2, que participan en la regulación de IL-10 y validar su expresión.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Preparación de Bacterias

Bb12 se cultivó en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS; BD Difco, EUA) suplementado con 0.05% de cisteína (Sigma-Aldrich, EUA) por 48 h a 37 °C. El cultivo de bifidobacterias se realizó bajo condiciones anaeróbicas estrictas, utilizando el sistema de anaerobiosis Gaspak™ (BD, EUA). Los cultivos se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min a 16° C (Centrifuge 5424, Eppendorf, EUA). Los sobrenadantes de cultivos de Bb12 se colectaron y ajustaron a pH 7.4 y filtraron utilizando filtros de 0.22 µm (Millex-GP, Millipore Corp., Irlanda). El paquete celular bacteriano se lavó con una solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 4.2 mM) y la concentración bacteriana fue ajustada a 6×10^8 UFC/mL, correspondiente al estándar #2 de McFarland.

5.2. Obtención de Sangre Periférica

Para realizar esta investigación se sacrificaron cerdos sanos de 6 a 8 meses de edad, provenientes de granjas cercanas a la ciudad (Hermosillo, Sonora, México). Se obtuvo sangre periférica por medio de punción de la vena cava y se utilizó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante en concentración de 1.5 mg/mL de sangre. Toda la experimentación con animales fue aprobada por el Comité de Ética de CIAD y se realizaron de acuerdo a los lineamientos de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

5.3. Obtención de Monocitos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll –Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia). Se utilizó buffer de lisis (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ y 1 mM EDTA) para eliminar eritrocitos contaminantes. La suspensión celular de PBMC obtenida se lavó con PBS y se resuspendió en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen Co., EUA) suplementado con gentamicina 50 µg/mL, penicilina 5000 UI/mL, estreptomycinina 5 µg/mL (antibióticos de Sigma-Aldrich, EUA) y 10 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco, EUA). Se colocaron 5 x 10⁷ PBMC en frascos de cultivo de 75 cm² (Corning Inc., EUA) y se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ por 90 min para la obtención de monocitos por adherencia. Los cultivos fueron lavados 4 veces con PBS frío e incubados 10 min con solución de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, EUA), para despegar los monocitos adheridos. La suspensión se colectó y se lavó, las células obtenidas se suspendieron en DMEM con antibióticos y 10% de SFB.

5.4. Estimulación de Monocitos con Bacterias

Se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ un total de 2 x 10⁵ monocitos en placas de 48 pozos con medio D-MEM suplementado (control negativo), suspensión de Bb12 (en proporción 1:100 célula/bacteria), por 2 o 4 h, con o sin bloqueo de TLR2, para el cual se utilizó un anticuerpo neutralizante anti-TLR2 (Biolegend, EUA) en concentración de 40 µg/mL una hora previa a la estimulación. Una vez transcurrido el tiempo, las células se colectaron en Qiazol (Qiagen, EUA) para posteriormente extraer el RNA. Para algunos experimentos se utilizó el sobrenadante de cultivo bacteriano (Bb12SN, 10% v/v).

5.5. Análisis de la Expresión de Genes y MiRNAs

El RNA total se obtuvo utilizando el kit de extracción RNeasy protec mini kit (Qiagen, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA fueron determinadas en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific, EUA). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un termociclador QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, EUA).

5.5.1. Análisis de la Expresión de Genes

Para la cuantificación de transcritos de IL-10, NF- κ B y TLR2 por RT-qPCR se utilizaron iniciadores y sondas de hidrólisis (fluoróforo 6-FAMTM), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1. Para la reacción de amplificación se utilizaron 50 ng de RNA total en una mezcla de reacción de 12.5 μ L de Brilliant II qRT-PCR Core Reagent Kit, 1-step (Stratagene, EUA), 0.75 μ L de cada iniciador (10 μ mol), y 0.5 μ L de sonda de hidrólisis (10 μ mol, FAM) (Integrated DNA Technologies; IDT, EUA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 50°C por 30 min y 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 60 s. La expresión relativa de IL-10, NF- κ B y TLR2 fue normalizada con la expresión del gen Peptidilpropil Isomerasa A (PPIA, Ciclofilina A), siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla 1. Secuencias de iniciadores y sondas utilizadas para el análisis de la expresión de genes por RT-qPCR.

Gen	Iniciador sentido (5' – 3')	Iniciador reverso (5' – 3')	Sondas de hidrólisis (5' – 3')
PPIA*	GCCATGGAGCGCTTTG G	TTATTAGATTTGTCCACA GTCAGCAAT	TGATCTTCTTGCTGGTCTTG CCATTCCT
IL-10*	TGAGAACAGCTGCATC CACTTC	TCTGGTCCTTCGTTTGAA AGAAA	CAACCAGCCTGCCCCACATG C
NF-κB*	CTGGCAGCTCTCCTCA AAGC	CACGAGTCATCCAGGTC ATACAG	CTCAAAGTTCTCCACCAGGG GA
TLR2	TTCAGGCCAAGGATTTT CAG [§]	TCACTGTGCTGGGTTTCAT TG [§]	TCTTCACATGAGGCGGCC [¶]

* Porcine immunology and Nutrition database (<http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=6065>).

§ Tohno et al. (2005).

¶ Secuencia diseñada en el laboratorio.

5.5.2. Análisis de la Expresión de MiRNAs

5.5.2.1. Expresión de miRNAs por microarreglo. A partir de RNA total, se analizó la expresión de 407 secuencias maduras de miRNAs de *Sus scrofa* en monocitos estimulados con Bb12, este análisis fue realizado por la compañía LC Sciences (Texas, EUA).

5.5.2.2. Expresión de miRNAs por RT-qPCR. Se sintetizó el cDNA en un termociclador MJ mini (Bio-Rad, EUA) se utilizaron 50 ng de RNA total para cada reacción de retrotranscripción. Cada mezcla de reacción contenía 1 µL de buffer poly(A) polimerasa 10x, ATP 0.1 mM, dNTP mix 0.1 mM, 100 unidades de MuLV transcriptasa reversa, 1 unidad de poly(A) polimerasa (New England Biolabs, EUA) y RT-primer 1 µM (5'-CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTNN, donde V es A, C o G y N es A, C, G o T). Las condiciones de retrotranscripción fueron: 60 min a 42°C y 5 min a 95°C para la inactivación de la enzima. Para la cuantificación de secuencias maduras de miRNAs se utilizó 1 µL de cDNA (diluido 1:4), 2 µL de 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) y una concentración de 250 nM de cada iniciador, todo en un volumen final de 10 µL. Las secuencias de iniciadores para la detección de miRNAs en cerdo, se tomaron de las reportadas por Mentzel y colaboradores (2014) o se diseñaron por medio de la

herramienta *miRprimerdesign3* (Busk, 2013).

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados.

Tabla 2. Secuencias de iniciadores utilizados para el análisis de la expresión de miRNAs por RT-qPCR.

miRNA	Iniciador sentido (5' – 3')	Iniciador reverso (5' – 3')
let-7c-5p	GCAGTGAGGTAGTAGGTTGTATG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAAACCA
let-7d-5p	AGAGAGGTAGTAGGTTGCAT	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACT
let-7e-5p	CAGTGAGGTAGGAGGTTGT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACTATAC
let-7f-5p	CGCAGTGAGGTAGTAGATTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACTATAC
let-7g-5p	CGCAGTGAGGTAGTAGTTTG	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAAC
miR-27b-3p	CAGTTCACAGTGGCTAAGTTC	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTGCAGA
miR-98-5p	CGCAGTGAGGTAGTAAGTTGT	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACA
miR-106a-5p	GAAAAGTGCTTACAGTGCAG	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTGCTAC
miR-148-3p	AGTCAGTGCATCACAGAAC	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTACAAAG
miR-191-5p	AACGGAATCCCAAAGCA	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAGC
miR-374a-5p	CGCGGTTATAATACAACCTGATA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCACT

5.6 Predicción de MiRNAs y Proteínas Blanco

Para la predicción de los miRNAs que regulan el transcrito de IL-10 se utilizaron TargetScan 7.1 (<http://www.targetscan.org>) y miRmap (<http://mirmap.ezlab.org/app/>). La predicción de las interacciones miRNA:mRNA reportadas en la bibliografía se realizó con miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>).

5.7. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados en el software Prism 6.0 (GraphPad, EUA), las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) o mediante una prueba de t. Los procedimientos de comparación múltiple fueron determinados por el método de Fisher LSD o Holm-Sidak según corresponda el caso, considerando significativos valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Participación de TLR2 en la Producción de IL-10 en Monocitos de Cerdo.

Para evaluar la participación de TLR2 en la expresión de IL-10, se determinó la concentración de anticuerpos necesaria para realizar el bloqueo total del receptor TLR2. Para lo anterior, se probaron tres distintas concentraciones de anti-TLR2 (10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) previo a la estimulación por 4 h con Bb12 (Figura 3). No se observó diferencia significativa con respecto a la estimulación de células con Bb12 al utilizar 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-TLR2. Sin embargo, disminuyó alrededor del 60% el transcrito de IL-10 al utilizar concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se inhibió al 100% la expresión del transcrito con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-TLR2 ($p < 0.05$).

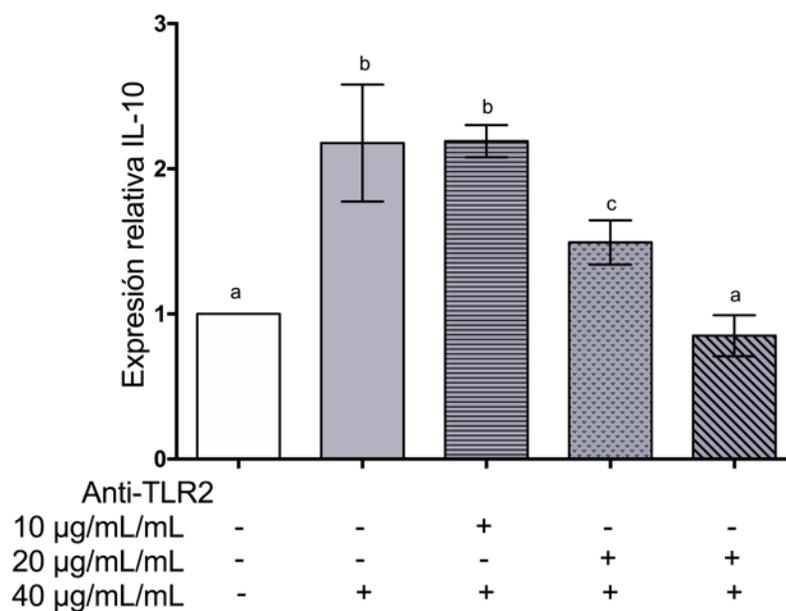


Figura 3. Expresión relativa de IL-10 por RT-qPCR en monocitos estimulados con Bb12 a distintas concentraciones de anti-TLR2. Los monocitos fueron estimulados 4h en proporción 1:100, (monocito:bacteria), con tratamiento previo con anticuerpos neutralizantes anti-TLR2 (10, 20 o 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. Comparaciones múltiples de Fisher LSD (***) $p < 0.001$).

Posteriormente, utilizando 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se evaluó la expresión de IL-10 inducida por Bb12 a las 2 y 4 h (Figura 4). No se observó cambio en la expresión de transcritos a las 2 h de incubación con la bacteria, mientras que después de 4 h, hubo un incremento de 2 veces la expresión de transcritos de IL-10, en comparación con monocitos sin estimular ($p < 0.001$).

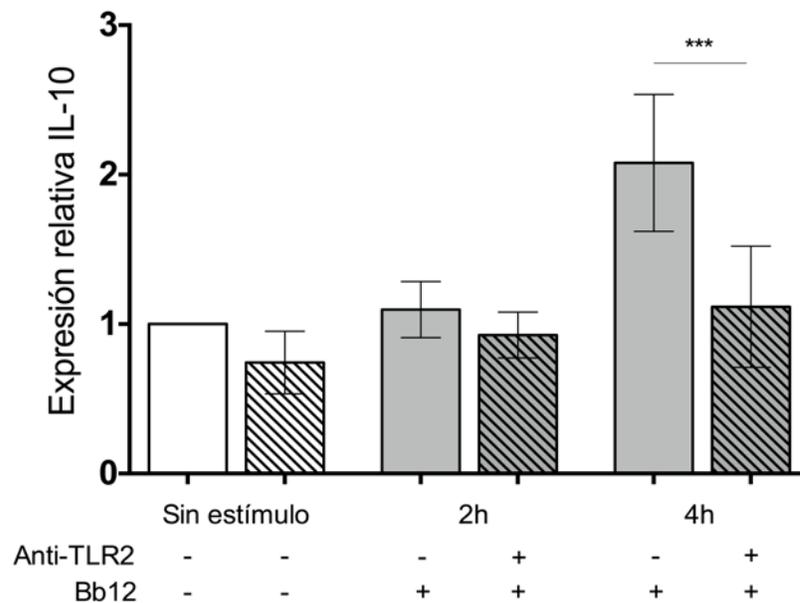


Figura 4. Expresión relativa de IL-10 por RT-qPCR en monocitos estimulados con Bb12. Los monocitos fueron estimulados por 2 y 4 h en proporción 1:100 (monocito:bacteria), con o sin tratamiento previo con anticuerpos neutralizantes anti-TLR2 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las barras representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. Comparaciones múltiples de Holm-Sidak (***) $p < 0.001$.

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tienen la capacidad de modular la producción de IL-10 en monocitos (Čitar et al., 2014) y una de las vías por la cual se produce es mediante la activación de TLR2. Se encontró que al bloquear TLR2 no hubo cambio en la expresión de IL-10. Este comportamiento coincide con estudios realizados con cepas de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* en DC, donde la ausencia del receptor TLR2 ocasiona un descenso en los niveles de IL-10 (Konieczna et al., 2015; Zeuthen et al., 2008). En estos estudios, los autores no descartan la participación en conjunto con otros receptores celulares como NOD2 y DC-SIGN. Nuestros resultados

sugieren que en las primeras horas de estimulación, la participación de TLR2 es primordial para la producción de IL-10.

Las bifidobacterias tienen la capacidad de secretar metabolitos con actividad inmunológica; así, el sobrenadante de *Bifidobacterium breve* puede inducir la producción de IL-10 en DC vía TLR2 (Hoarau et al., 2006). Por lo anterior, se determinó si la expresión de IL-10 se inducía por la interacción de Bb12 con TLR2 o por algún metabolito bacteriano. Se utilizó el sobrenadante del cultivo de bifidobacterias (Bb12SN) para estimular monocitos de cerdo durante 4 h, sin encontrar diferencias significativas en la expresión de IL-10 (Figura 5). Ya que algunas bacterias probióticas tienen la capacidad de producir metabolitos pos-bióticos, con propiedades inmuno-moduladoras, no se puede descartar que la estudiada carezca de éstas. Quizá no se dieron las condiciones adecuadas para que la bacteria estuviera metabólicamente activa, ya que el cultivo celular se llevó a cabo con 5% de CO₂ mientras que Bb12 es una bacteria estrictamente anaerobia. Por esto, podemos confirmar que a las 4 h de estimulación, la expresión de IL-10 es inducida principalmente por la interacción de Bb12 con TLR2 y no por algún metabolito bacteriano.

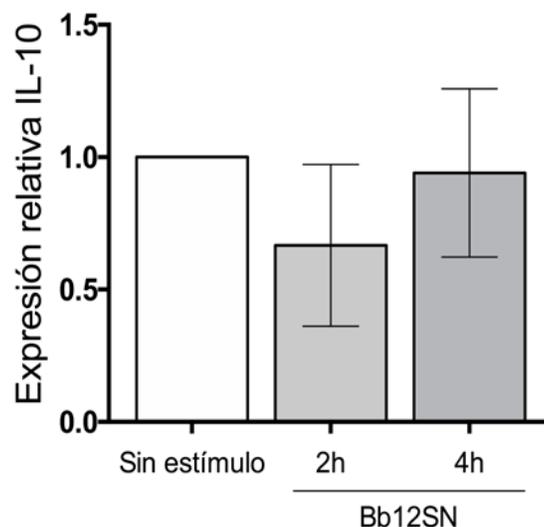


Figura 5. Expresión relativa de IL-10 por RT-qPCR en monocitos estimulados con sobrenadante de Bb12 (Bb12SN). Los monocitos fueron estimulados por 2 y 4 h. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes. Comparación múltiple de Holm-Sidak (* $p < 0.05$).

La señalización de TLR2 da como resultado la activación de NF- κ B y de las proteínas

MAPKs (ERK, JNK y p38). La activación de MAPKs es necesaria para la inducción de la producción de IL-10 por TLR (Akira y Takeda, 2004). En monocitos y macrófagos, se ha comprobado que NF- κ B regula directamente la transcripción de IL-10 al unirse con el promotor de *il10*. Sin embargo, la señalización de ERK y p38, también están implicadas en la regulación transcripcional de IL-10 en macrófagos y DC (Saraiva y O'Garra, 2010). Se evaluó la expresión del factor de transcripción NF- κ B a las 2 y 4 h de estimulación con Bb12 (Figura 6). No se encontraron cambios significativos en su expresión por efecto de los tratamientos. Esto podría indicar que NF- κ B no es el factor de transcripción principal o parcial de la expresión de IL-10 en nuestro estudio. No se analizó la expresión de otros factores de transcripción como podría ser AP-1, por las vías MAPK.

Los resultados presentados en esta sección se encuentran en **Arenas-Padilla M, Duarte-Gutiérrez JL, Mata-Haro V. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 induces IL-10 through cell membrane-associated components via TLR2 in swine. J Appl Microbiol. 2018 Aug 14. doi: 10.1111/jam.14069.**

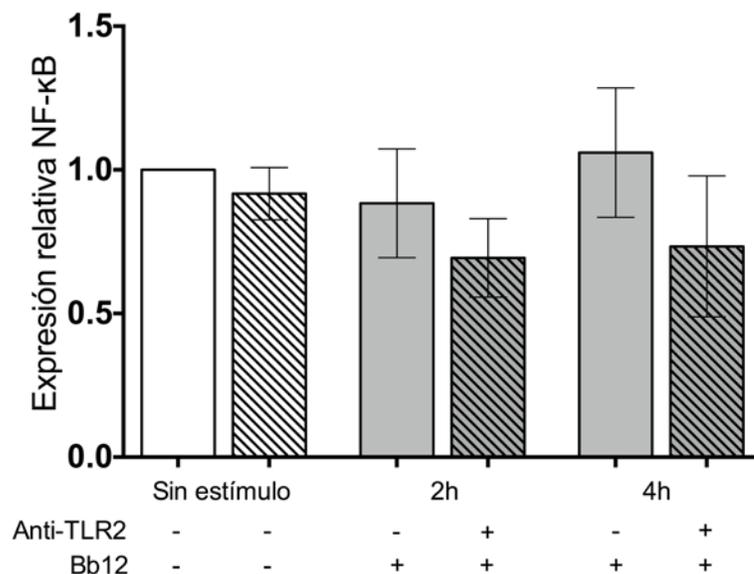


Figura 6. Expresión relativa de NF- κ B por RT-qPCR en monocitos estimulados con Bb12. Los monocitos fueron estimulados por 2 y 4 h en proporción 1:100 (monocito:bacteria), con o sin tratamiento previo con anticuerpo neutralizante anti-TLR2 (40 μ g/mL). Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

6.2. Predicciones *In silico* de MiRNAs Involucrados en la Regulación del Transcrito de IL-10

Las herramientas para predecir interacciones miRNA:mRNA *in silico*, usan diferentes algoritmos y están diseñadas para obtener resultados precisos y disminuir las tasas de falsos positivos que pudieran generarse. Aun así, la predicción efectiva de esta interacción sigue siendo un desafío (Ritchie et al., 2009), por lo que para la predicción de los miRNAs con blanco en IL-10, se utilizaron 2 herramientas bioinformáticas: TargetScan (Agarwal et al., 2015) y miRmap (Vejnar y Zdobnov, 2012). MiRmap emplea características termodinámicas, evolutivas, probabilísticas o basadas en secuencias para la predicción de blancos. Por su parte, TargetScan permite una búsqueda a nivel de isoforma, penaliza las interacciones menos conservadas y su base de datos está más actualizada. Esta última, puede predecir las interacciones miRNA:mRNA con una mayor probabilidad de validación biológica, que otras herramientas populares como DIANA tools y miRanda (Riffo-Campos et al., 2016). TargetScan realiza una alineación de las secuencias de los mRNA entre distintas especies de vertebrados y muestra los sitios de interacción, por lo que hizo posible confirmar interacciones en el mRNA de IL-10 en cerdo.

Por un lado, miRmap reveló 502 miRNAs con blanco en IL-10, mientras que TargetScan un total de 392 con el mismo blanco. Se seleccionaron aquellos miRNAs que coincidieron en ambas predicciones, y que están conservados entre vertebrados y entre mamíferos en base a los alineamientos en TargetScan, en el cual se consideran coincidencias con regiones 3'UTR humanas y sus ortólogos (Figura 7).

En base a esto, se obtuvieron un total de 20 miRNAs conservados con sus respectivos valores de predicción, así como la posición 3'UTR en el mRNA, donde podría darse la unión (Tabla 3).

Human IL10 ENST00000423557.1 3' UTR length: 1034

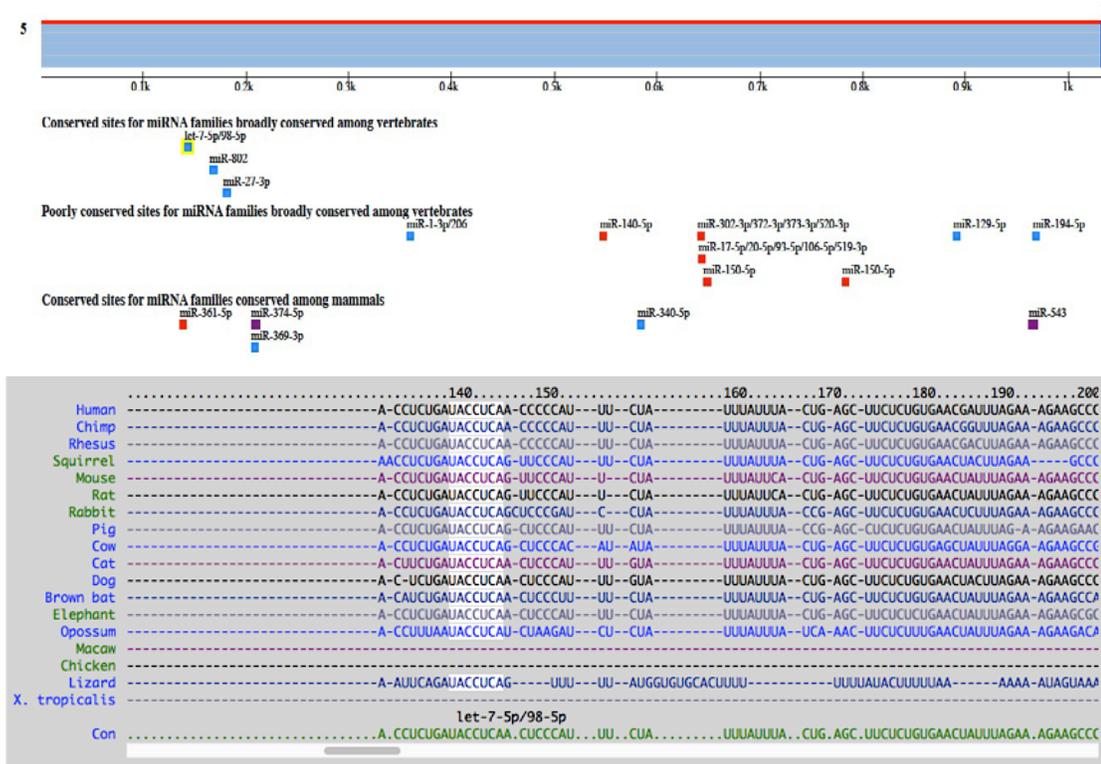


Figura 7. Imagen ilustrativa del análisis de alineación de secuencias en TargetScan 7.1.

Tabla 3. Predicción de MiRNAs conservados entre vertebrados y mamíferos con blanco en IL-10 obtenidos por TargetScan 7.1.

miRNA	Posición en la región 3'UTR de IL-10	context++ score	P_{CT}
miR-361-5p	135-141	-0.16	N/A
let-7d-5p	140-146	-0.35	0.95
let-7e-5p	140-146	-0.33	0.95
let-7b-5p	140-146	-0.32	0.95
miR-4458-5p	140-146	-0.33	0.95
let-7c-5p	140-146	-0.32	0.95
let-7g-5p	140-146	-0.32	0.95
let-7f-5p	140-146	-0.32	0.95
let-7a-5p	140-146	-0.32	0.95
miR-98-5p	140-146	-0.32	0.95
let-7i-5p	140-146	-0.31	0.95
miR-4500-5p	140-146	-0.29	0.95
miR-802-5p	165-171	-0.12	0.31
miR-27a-3p	178-184	-0.14	0.58
miR-27b-3p	178-184	-0.14	0.58
miR-374b-5p	205-212	-0.25	N/A
miR-374a-5p	205-212	-0.23	N/A
miR-369-3p	205-211	-0.05	N/A
miR-340-5p	581-587	-0.01	N/A
miR-543-5p	962-969	-0.19	N/A

En los mamíferos, las predicciones *in silico* se clasifican en función del valor de “context++ score” en el cual se considera el tipo de sitio de unión y otras 14 características, para predecir los mRNA blanco más eficazmente (Agarwal et al., 2015), a mayor negatividad en la puntuación, mayor será la represión del mRNA blanco. Las predicciones también se clasifican según el valor de P_{CT} (Probability of Conserved Targeting), el cual proporciona un criterio útil para evaluar la relevancia biológica de las interacciones predichas. Los valores de P_{CT} van entre 0 y 1, cuanto mayor sea el puntaje, mayor será la probabilidad de que un sitio se conserve y mayor será la desestabilización del mRNA (Friedman et al., 2009). Los sitios conservados poseen mayor probabilidad de tener una función biológica detectable, incluso en animales de experimentación que son pertinentes para los humanos.

6.3. Expresión de MiRNAs en Monocitos de Cerdo Estimulados con Bb12

Para cuantificar la expresión de miRNAs involucrados en la señalización por TLR2, se estimularon monocitos de cerdo con Bb12 y se bloqueó con anticuerpos anti-TLR2. Posteriormente se realizó un microarreglo, seguido del análisis de la información obtenida. Finalmente, se seleccionaron los miRNAs de interés y se validó su expresión por RT-qPCR.

6.3.1. Análisis de la Expresión de MiRNAs en Monocitos de Cerdo por Microarreglo

Hay poca información publicada sobre los miRNAs y su función en el sistema inmune de cerdo, así como su expresión en monocitos. Por esto, se realizó un microarreglo para detectar los cambios en el microtranscriptoma en respuesta a Bb12, así como para identificar aquellos miRNAs a utilizar como referencia para el estudio. Para lo cual se estimularon monocitos de cerdo con Bb12 por 4 h con y sin bloqueo del receptor TLR2 (Anti-TLR2 + Bb12) con el fin de analizar los miRNAs inducidos por dicha vía. Se analizó la expresión de un total de 407 miRNAs para cerdo. Una vez obtenidos los datos del arreglo se realizó una selección de aquellos con intensidad de fluorescencia media (MFI) >150, para posibilitar su detección por RT-qPCR y así validar la información obtenida en el microarreglo. El valor de MFI mínima a considerar, se determinó mediante la cuantificación por RT-qPCR de distintos miRNAs que presentaron bajos valores de MFI (\approx 50, 150, 250 y 500) (datos no mostrados).

Se encontraron 111 miRNAs que presentaron una MFI >150, donde 34 miRNAs no presentan cambios en su expresión ante los tratamientos (Bb12 o anti-TLR2 + Bb12) (Figura 8). De estos 34, se eligieron 11 como candidatos a miRNAs de referencia para el estudio. La elección de los miRNAs de referencia se realizó calculando el coeficiente de variación (CV) entre las MFI de los tratamientos, y eligiendo aquellos con valor menor o igual a 5%, indicados en color gris en la Tabla 4.

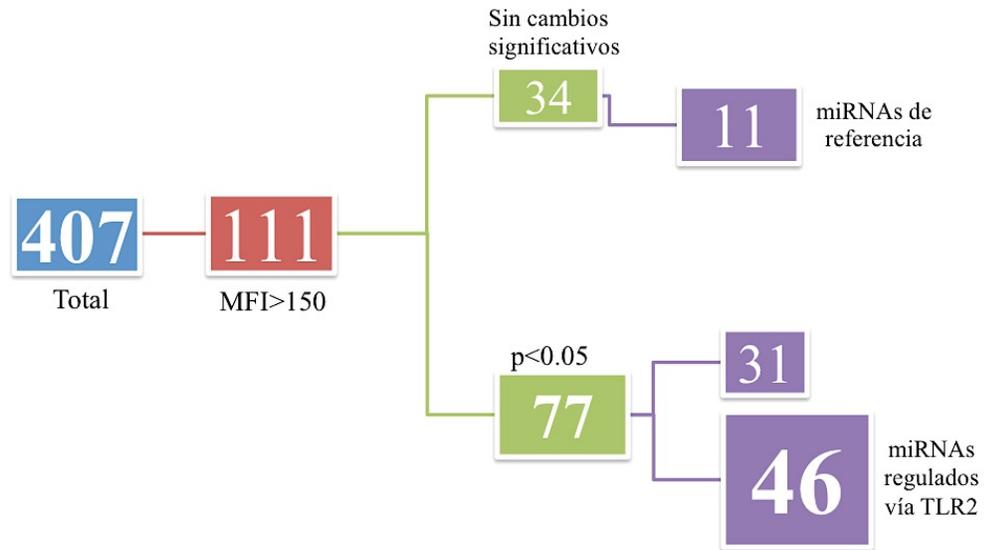


Figura 8. Diagrama de organización y selección de miRNAs analizados en el microarreglo.

Además, se encontraron 77 miRNAs expresados diferencialmente por efecto de alguno de los tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla 5), de los cuales 46 miRNAs son afectados por TLR2 (Tabla 6). Para la elección de los 46 miRNAs, se descartaron aquellos miRNAs en los cuales no hubo diferencias significativas en su expresión al comparar entre los tratamientos Bb12 y anti-TLR2 + Bb12. Esto indica que TLR2 no está involucrado en la expresión de estos miRNAs y que pueden ser inducidos por la bacteria por otra vía de señalización.

Los cambios en la expresión de los miRNAs se representan con “fold change”, donde el cero representa la expresión basal de estos miRNAs en monocitos. En las publicaciones de microarreglos es habitual referirse a cambios en intensidades de fluorescencia en términos del “fold change”. Un “fold change” correspondería a un cambio del 100% de la intensidad con respecto al control.

Además, se identificaron 16 miRNAs (indicados en color gris en la Tabla 6) cuya expresión incrementó significativamente ($p < 0.05$), inducida por Bb12 por medio de la activación de TLR2. Comprobando que al bloquear TLR2, dicha expresión se ve disminuida o abolida significativamente ($p < 0.05$). Los cambios en el perfil de miRNAs

pueden generarse por la activación de las vías de TLR, ya sea por reconocimiento de ligandos o en respuesta a microorganismos (He et al., 2014).

Tabla 4. Selección de miRNAs de referencia.

miRNA	MFI			CV (%)
	Sin estímulo	Bb12	Anti-TLR2 +Bb12	
ssc-let-7a-5p	3,211	3,008	4,242	19.0
ssc-let-7i-5p	3,531	3,437	3,485	1.4
ssc-miR-17-5p	2,469	2,459	2,357	2.6
ssc-miR-18a-5p	478	492	293	26.3
ssc-miR-19a-5p	237	191	241	12.4
ssc-miR-22-3p	867	809	871	4.1
miR-23b-5p	2,733	1,660	3,022	29.0
ssc-miR-24-3p	9,539	9,574	10,111	3.3
ssc-miR-27a-5p	2,535	2,755	2,288	9.2
ssc-miR-99a-5p	222	205	186	8.8
ssc-miR-106a-5p	2,093	1,981	2,119	3.5
ssc-miR-107-5p	2,849	2,787	2,507	6.7
ssc-miR-128-5p	644	558	563	8.2
ssc-miR-132-5p	254	282	265	5.3
ssc-miR-142-5p	6,710	6,156	7,008	6.5
ssc-miR-146a-5p	7,902	8,692	7,227	9.2
ssc-miR-148a-3p	1,347	1,480	1,421	4.7
ssc-miR-148b-3p	1,186	1,203	1,166	1.6
ssc-miR-151-3p	212	229	212	4.5
ssc-miR-181c-5p	1,157	1,443	865	25.1
ssc-miR-185-5p	1,019	1,098	1,000	5.0
ssc-miR-186-5p	1,629	1,928	1,698	9.0
ssc-miR-191-5p	12,557	12,752	12,816	1.1
ssc-miR-214-5p	478	668	691	19.1
ssc-miR-342-5p	2,138	1,957	2,137	5.0
ssc-miR-361-5p	648	621	577	5.8
ssc-miR-363-5p	869	831	956	7.2
ssc-miR-374b-5p	771	674	832	10.5
ssc-miR-378-5p	483	587	530	9.7
ssc-miR-505-5p	263	236	272	7.2
ssc-miR-532-5p	480	641	493	16.6
ssc-miR-4332-5p	3,247	3,856	3,350	9.4
ssc-miR-7134-3p	1,297	1,223	1,156	5.7
ssc-miR-9856-3p	2,738	3,575	1,984	28.8

Tabla 5. MFI de miRNAs diferencialmente expresados por efecto de los tratamientos.

miRNAs	MFI		
	Sin estímulo	Bb12	Anti-TLR2 +Bb12
ssc-let-7c-5p	1,088	1,047	1,852
ssc-let-7d-5p	3,354	3,198	4,213
ssc-let-7e-5p	274	283	718
ssc-let-7f-5p	8,150	7,772	9,102
ssc-let-7g-5p	6,410	6,279	7,006
ssc-miR-7-5p	364	451	416
ssc-miR-15a-5p	6,844	8,537	6,551
ssc-miR-16-5p	16,776	19,904	18,892
ssc-miR-21-5p	14,637	13,084	12,598
ssc-miR-23a-5p	6,318	5,063	5,381
ssc-miR-27b-3p	255	272	356
ssc-miR-29b-3p	2,894	3,782	3,254
ssc-miR-30b-3p	416	611	891
ssc-miR-30b-5p	5,212	6,968	5,734
ssc-miR-30c-3p	401	481	948
ssc-miR-30d-5p	4,306	4,970	4,637
ssc-miR-30e-3p	233	216	297
ssc-miR-30e-5p	5,383	7,101	5,100
ssc-miR-92a-3p	3,210	2,567	3,693
ssc-miR-92b-3p	761	650	1,110
ssc-miR-98-5p	583	671	770
ssc-miR-103-3p	2,976	2,868	2,545
ssc-miR-146b-5p	1,184	1,063	1,732
ssc-miR-150-5p	12,115	11,288	13,998
ssc-miR-151-5p	1,389	1,454	1,196
ssc-miR-155-5p	2,054	2,259	2,580
ssc-miR-181a-5p	4,201	4,962	3,921
ssc-miR-181b-5p	551	585	470
ssc-miR-221-3p	2,431	2,201	2,010
ssc-miR-320-5p	300	320	419
ssc-miR-339-5p	710	521	568
ssc-miR-339-2-5p	480	346	431
ssc-miR-345-3p	2,074	2,384	1,077
ssc-miR-362-5p	537	587	501
ssc-miR-374a-5p	439	471	681
ssc-miR-425-5p	3,402	3,812	3,974
ssc-miR-671-5p	1,254	1,707	1,037
ssc-miR-1285-5p	1,914	1,855	3,746
ssc-miR-4331-5p	926	779	888
ssc-miR-4334-5p	1,161	1,225	685
ssc-miR-7134-5p	214	158	222
ssc-miR-7139-3p	183	263	166
ssc-miR-9791-3p	282	337	378

ssc-miR-9820-5p	945	980	1,098
ssc-miR-9846-3p	188	256	209
ssc-miR-9858-5p	293	481	398
ssc-miR-15b-5p	4,703	4,997	5,816
ssc-miR-18b-5p	342	386	253
ssc-miR-19b-3p	3,501	2,584	2,414
ssc-miR-20a-5p	3,466	3,087	3,098
ssc-miR-20b-5p	3,093	2,898	2,881
ssc-miR-26a-5p	10,953	12,500	12,435
ssc-miR-29a-5p	3,840	3,213	3,328
ssc-miR-29c-5p	1,359	970	1,013
ssc-miR-30a-5p	1,953	2,285	2,306
ssc-miR-30c-1-3p	10,098	11,810	14,307
ssc-miR-30c-5p	3,997	4,507	4,583
ssc-miR-101-5p	734	625	527
ssc-miR-130b-5p	396	413	353
ssc-miR-140-3p	5,803	5,856	5,305
ssc-miR-140-5p	201	157	172
ssc-miR-142-3p	5,531	4,459	4,911
ssc-miR-181d-5p	240	255	268
ssc-miR-222-5p	1,679	1,461	1,416
ssc-miR-296-3p	200	219	217
ssc-miR-340-5p	460	543	541
ssc-miR-378b-3p	212	235	253
ssc-miR-423-5p	1,350	1,165	1,238
ssc-miR-425-3p	173	154	170
ssc-miR-574-5p	140	502	905
ssc-miR-1307-5p	2,853	2,215	1,956
ssc-miR-4334-3p	916	638	637
ssc-miR-9802-3p	582	1,013	1,106
ssc-miR-9831-3p	159	203	186
ssc-miR-9832-3p	443	587	546
ssc-miR-9841-3p	802	691	649
ssc-miR-9847-3p	1,161	925	662

Tabla 6. Cambio en la expresión de miRNAs correlacionados con TLR2.

miRNA	Bb12			Anti-TLR2 + Bb12		
	Fold change		Valor de p	Fold change		Valor de p
ssc-let-7c-5p	-0.06	-	NS	0.77	↑	<0.0001
ssc-let-7d-5p	-0.07	-	NS	0.33	↑	<0.0001
ssc-let-7e-5p	0.05	-	NS	1.39	↑	<0.0001
ssc-let-7f-5p	-0.07	-	NS	0.16	↑	<0.0001
ssc-let-7g-5p	-0.03	-	NS	0.13	↑	0.0009
ssc-miR-7-5p	0.31	↑	<0.0001	0.19	↑	0.0031
ssc-miR-15a-5p	0.32	↑	0.0018	-0.06	-	NS
ssc-miR-16-5p	0.25	↑	0.0005	0.17	↑	0.0052
ssc-miR-21-5p	-0.16	↓	0.0055	-0.22	↓	0.0009
ssc-miR-23a-5p	-0.32	↓	<0.0001	-0.23	↓	<0.0001
ssc-miR-27b-3p	0.09	-	NS	0.48	↑	<0.0001
ssc-miR-29b-3p	0.39	↑	0.0089	0.17	-	NS
ssc-miR-30b-3p	0.56	↑	<0.0001	1.10	↑	<0.0001
ssc-miR-30b-5p	0.42	↑	<0.0001	0.14	↑	0.0084
ssc-miR-30c-3p	0.26	-	NS	1.24	↑	<0.0001
ssc-miR-30d-5p	0.21	↑	0.0008	0.11	↑	0.0302
ssc-miR-30e-3p	-0.11	-	NS	0.35	↑	0.0072
ssc-miR-30e-5p	0.40	↑	<0.0001	-0.08	-	NS
ssc-miR-92a-5p	-0.32	-	NS	0.20	↑	0.0062
ssc-miR-92b-3p	-0.23	-	NS	0.55	↑	0.0051
ssc-miR-98-5p	0.20	-	NS	0.40	↑	0.0240
ssc-miR-103-5p	-0.05	-	NS	-0.23	↓	0.0021
ssc-miR-146b-5p	-0.16	-	NS	0.55	↑	0.0002
ssc-miR-150-5p	-0.10	↓	0.0427	0.21	↑	0.0008
ssc-miR-151-5p	0.07	-	NS	-0.22	↓	0.0038
ssc-miR-155-5p	0.14	-	NS	0.33	↑	0.0009
ssc-miR-181a-5p	0.24	↑	0.0052	-0.10	-	NS
ssc-miR-181b-5p	0.09	↑	0.0280	-0.23	↓	<0.0001
ssc-miR-221-3p	-0.14	↓	0.0017	-0.27	↓	<0.0001
ssc-miR-320-5p	0.09	-	NS	0.48	↑	<0.0001
ssc-miR-339-5p	-0.45	↓	<0.0001	-0.32	↓	0.0002
ssc-miR-339-2-5p	-0.47	↓	<0.0001	-0.16	↓	0.0036
ssc-miR-345-3p	0.20	↑	0.0023	-0.95	↓	<0.0001
ssc-miR-362-5p	0.13	↑	0.0365	-0.10	-	NS
ssc-miR-374a-5p	0.10	-	NS	0.63	↑	0.0015
ssc-miR-425-5p	0.16	↑	0.0016	0.22	↑	0.0002
ssc-miR-671-5p	0.44	↑	<0.0001	-0.27	↓	0.0004
ssc-miR-1285-5p	-0.05	-	NS	0.97	↑	<0.0001
ssc-miR-4331-5p	-0.25	↓	0.0043	-0.06	-	NS
ssc-miR-4334-5p	0.08	↑	0.0291	-0.76	↓	<0.0001
ssc-miR-7134-5p	-0.44	↓	0.0004	0.05	-	NS
ssc-miR-7139-3p	0.52	↑	0.0244	-0.14	-	NS
ssc-miR-9791-3p	0.26	↑	0.0108	0.42	↑	0.0005
ssc-miR-9820-5p	0.05	-	NS	0.22	↑	0.0009
ssc-miR-9846-3p	0.45	↑	<0.0001	0.16	↑	0.0168
ssc-miR-9858-5p	0.71	↑	0.0007	0.44	↑	0.0080

↑: sobreexpresión, ↓: subexpresión, NS: No significativo

6.3.2. Análisis de la Expresión de MiRNAs por RT-qPCR

Se validó la información obtenida en el microarreglo de los miRNAs con posible papel en la regulación del transcrito de IL-10, mediante RT-qPCR. Se realizó el análisis de la estabilidad de los miRNAs de referencia seleccionados con la herramienta RefFinder. La expresión de los miRNAs cuantificados se normalizaron usando la media de la expresión de miR-148b-3p y miR-191-5p.

Se seleccionaron aquellos miRNAs que aparecen en las predicciones *in silico* y que fueron analizados en el microarreglo (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, miR-98-5p, miR-27b-3p y miR-374a-5p). En la Figura 9 se muestra la expresión relativa de estos miRNAs en respuesta a los tratamientos.

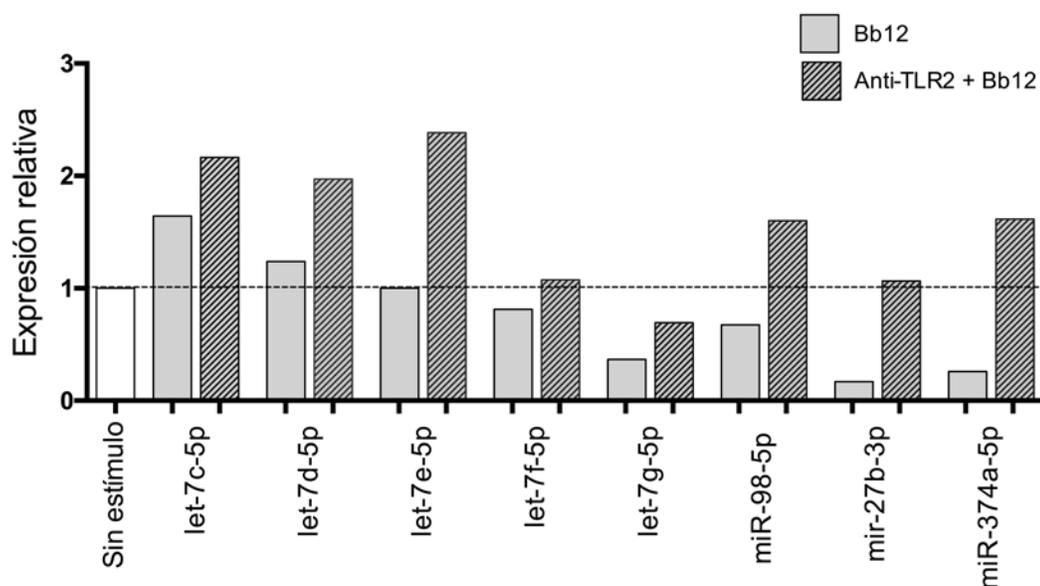


Figura 9. Validación de la expresión de miRNAs con blanco en IL-10 por RT-qPCR. Expresión relativa normalizada con la expresión de miR-148b-3p y miR-191-5p en monocitos estimulados con Bb12 (Proporción 1:100, monocito:bacteria) por 4 h, con o sin tratamiento previo con anticuerpo neutralizante anti-TLR2 (40 µg/mL).

Al comparar los resultados obtenidos en el microarreglo y por RT-qPCR se presenta la misma tendencia ante los tratamientos. La familia let-7, es una familia de miRNAs involucrada en la regulación de múltiples genes, como los de la regulación post-transcripcional de la respuesta inmune innata ante agentes patógenos.

Al estimular macrófagos con bacterias vivas o componentes microbianos, se inhibe la expresión de varios miembros de la familia let-7, lo que reduce la represión de citocinas tales como IL-6 e IL-10 (Schulte et al., 2 Liu et al., 2011). La familia let-7 también se ha visto implicada en la regulación de la expresión de TLR4, el receptor más importante de LPS, principal componente de las membranas de bacterias Gram negativas (Androulidaki et al., 2009). Swaminathan et al. (2012), publicaron que al inhibir a algunos de los miembros de la familia let-7, se incrementó la expresión de IL-10 en linfocitos T hasta en un 300%. Por el contrario, la sobre-expresión de let-7b, let-7c y let-7f, solos o en combinación, reduce los niveles de IL-10 en un 65%.

6.4. Determinación de Proteínas Blanco Participantes en la Vía TLR2/IL-10 por MiRNAs en Respuesta a Bb12

Para proponer un mecanismo de regulación por miRNAs, se realizó la predicción de las posibles proteínas blanco de los 47 miRNAs de interés, lo que aporta información sobre las posibles proteínas afectadas por su expresión. Se utilizó miRTarBase, una base de datos que contiene información sobre más de 400,000 interacciones miRNA:mRNA en 23 especies distintas, validadas experimentalmente (Chou et al., 2015). Además, se confirmó en TargetScan que los sitios de interacción se encuentren en las secuencias 3'UTR de *Sus scrofa*.

En la figura 10 se muestra un diagrama con el mecanismo propuesto de regulación de IL-10 por miRNAs en respuesta a Bb12. Este mecanismo es en base a los resultados obtenidos sobre la expresión de IL-10, nuestras predicciones *in silico*, los cambios en la expresión de miRNAs y sus predicciones de proteínas blanco resultantes mediante el análisis en miRTarBase. En base a lo anterior se propone que la regulación puede ser directa e indirecta.

En la regulación directa participan la familia let-7-5p (let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g y miR-98), miR-27b-3p y miR-374a-5p; los cuales podrían estar regulando directamente la expresión del transcrito de IL-10 en monocitos de cerdo. Estos miRNAs no presentan

cambios significativos al estimular con Bb12, mientras que al bloquear TLR2 se eleva su expresión (Tabla 6), lo que podría estar causando una represión directa del mRNA de IL-10 (Figura 1). Además, éstos se encuentran dentro de los 20 miRNAs con blanco en IL-10 de nuestras predicciones *in silico*. Aunado a lo anterior, existe evidencia de la interacción de let-7c-5p (Jiang et al., 2012), let-7e-5p (Guan et al., 2013), miR-98 (Li et al., 2016) y miR-27b-3p (Xie et al., 2014).

Tomando en cuenta que let-7 se ha descrito como una familia de miRNAs con papel pro-inflamatorio (Polikepahad et al., 2010), podría explicarse un posible papel anti-inflamatorio de TLR2 en el reconocimiento de Bb12. Esto podría deberse a la inducción del factor de transcripción: proteína de maduración inducida por linfocito B 1 (BLIMP-1). La función de BLIMP-1 se ha descrito principalmente en torno a la regulación de células plasmáticas, sin embargo, su ausencia se asocia a perfiles pro-inflamatorios. La ausencia del gen *Prdm1*, que codifica a BLIMP-1 en DC, puede contribuir al desencadenamiento de autoinmunidad (Kim et al., 2017). Además, esta proteína funge como represor transcripcional de let-7c en DC, en su ausencia aumentan los niveles de let-7c (Kim et al., 2013). Aunque su función en respuesta a microorganismos no ha sido muy estudiada, se ha demostrado la inducción de BLIMP-1 en respuesta a ligandos de TLR2/TLR4, con activación de la señalización por MAPK (Lin et al., 2006).

Por otra parte, en la regulación indirecta se propone que la expresión de IL-10 también podría estar regulada a nivel de señalización. En esta, los miRNAs miR-146b-5p y miR-155-5p han sido descritos ampliamente por su importancia en la regulación de vías TLR (Taganov et al., 2006) y también en la diferenciación de células del sistema inmune (Navarro y Lieberman, 2010). miR-146b-5p tiene como blanco a IRAK1 y TRAF6; proteínas clave en la señalización de TLR2 y sus interacciones con el mRNA de IL-10 han sido validadas experimentalmente (Chou et al., 2016; Liu et al., 2015; Taganov et al., 2006; Xie et al., 2013). Al bloquear el receptor TLR2 se incrementa la expresión de miR-146b-5p, lo que puede estar causando la represión de las proteínas de la vía y por ende la expresión de IL-10.

De igual manera que la anterior descrita, sucede con miR-155-5p, este miRNA reprime a TAB2 (Ceppi et al., 2009; Muylkens et al., 2010; Xu et al., 2013; Xu et al., 2010) y además a la proteína c-Fos, la cual junto con c-Jun, forma parte del factor de transcripción AP-1.

Los miRNAs let-7b-5p y miR-98-5p además de regular directamente el transcrito de IL-10, también tienen blanco en TAB2 (Gennarino et al., 2009; Helwak et al., 2013).

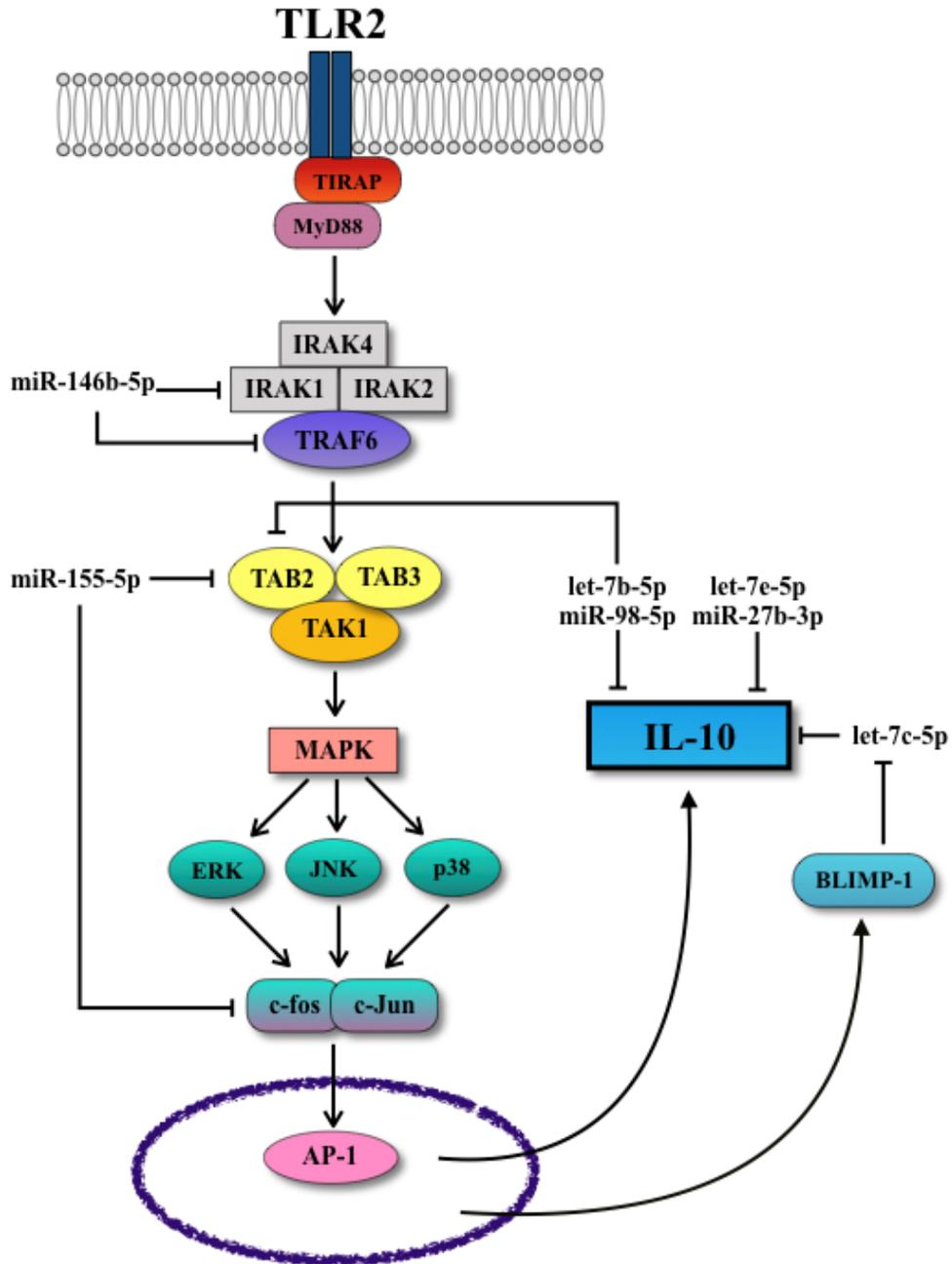


Figura 10. Mecanismo propuesto de la regulación de IL-10 por miRNAs en respuesta a Bb12.

7. CONCLUSIONES

La activación de TLR2 en monocitos de cerdo por *Bifidobacterium lactis* ssp. *lactis* Bb12, induce la expresión diferencial de miRNAs capaces de regular IL-10. Se identificaron los miRNAs inducidos por el probiótico que podrían estar regulando la expresión de IL-10 a distintos niveles. Además, la activación de TLR2 induce miRNAs seguramente con participación activa en la capacidad inmunomoduladora del probiótico. Dentro de estos miRNAs se encuentran let-7b-5p, let-7c-5p, let-7e-5p, miR-98-5p y miR-27b-3p, que participan en la regulación del transcrito de IL-10 y de algunas proteínas de importancia en la señalización TLR2/IL-10. Con los debidos estudios posteriores, estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de terapias dirigidas basadas en miRNAs.

8. REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2014. Cellular and molecular immunology E-book. Elsevier Health Sciences.
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., Bartel, D.P., 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *elife* 4, e05005.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., Pulendran, B., 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *The Journal of Immunology* 171, 4984-4989.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology* 4, 499-511.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9, 277-279.
- Ameres, S.L., Zamore, P.D., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 475-488.
- Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A.N., Tschlis, P.N., Tsatsanis, C., 2009. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 31, 220-231.
- Arenas-Padilla, M., Mata-Haro, H., 2018. Regulation of TLR signaling pathways by microRNAs: implications in inflammatory diseases. *Central European Journal of Immunology* Accepted manuscript.
- Asirvatham, A.J., Gregorie, C.J., Hu, Z., Magner, W.J., Tomasi, T.B., 2008. MicroRNA targets in immune genes and the Dicer/Argonaute and ARE machinery components. *Molecular immunology* 45, 1995-2006.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bazzini, A.A., Lee, M.T., Giraldez, A.J., 2012. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233-237.
- Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L., Gershwin, M.E., 2009. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 44, 26-46.
- Busk, P.K., 2013. miRprimerdesign3.
- Ceppi, M., Pereira, P.M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M.A., Pierre, P., 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 2735-2740.
- Chou, C.-H., Chang, N.-W., Shrestha, S., Hsu, S.-D., Lin, Y.-L., Lee, W.-H., Yang, C.-D., Hong, H.-C., Wei, T.-Y., Tu, S.-J., 2015. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic acids research* 44, D239-D247.
- Chou, C.-K., Chi, S.-Y., Huang, C.-H., Chou, F.-F., Huang, C.-C., Liu, R.-T., Kang, H.-Y., 2016. IRAK1, a target of miR-146b, reduces cell aggressiveness of human papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101, 4357-4366.
- Chu, C.Y., Rana, T.M., 2007. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of cellular physiology* 213, 412-419.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., 2010. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694-1698.

- Čitar, M., Hacin, B., Tompa, G., Štampelj, M., Rogelj, I., Dolinšek, J., Narat, M., Matijašić, B.B., 2014. Human intestinal mucosa-associated Lactobacillus and Bifidobacterium strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Beneficial microbes* 6, 325-336.
- Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S., Pulendran, B., 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *The Journal of Immunology* 172, 4733-4743.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., Green, R., 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237-240.
- Eulalio, A., Schulte, L., Vogel, J., 2012. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA biology* 9, 742-750.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T., 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine* 170, 2081-2095.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., 2008. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nature genetics* 40, 1319-1323.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.
- Gat-Viks, I., Chevrier, N., Wilentzik, R., Eisenhaure, T., Raychowdhury, R., Steuerman, Y., Shalek, A.K., Hacohen, N., Amit, I., Regev, A., 2013. Deciphering molecular circuits from genetic variation underlying transcriptional responsiveness to stimuli. *Nature biotechnology* 31, 342-349.
- Gennarino, V.A., Sardiello, M., Avellino, R., Meola, N., Maselli, V., Anand, S., Cuttillo, L., Ballabio, A., Banfi, S., 2009. MicroRNA target prediction by expression analysis of host genes. *Genome research* 19, 481-490.
- González-Rascón, A., Mata-Haro, V., 2015. MicroRNAs: Regulators of TLR2-Mediated Probiotic Immune Responses. *MicroRNA* 4, 168-174.
- Grazia Roncarolo, M., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., Levings, M.K., 2006. Interleukin - 10 - secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 212, 28-50.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., 2007. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 36, D154-D158.
- Guan, H., Fan, D., Mrelashvili, D., Hao, H., Singh, N.P., Singh, U.P., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M., 2013. MicroRNA let - 7e is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology* 43, 104-114.
- Guo, H., Chen, Y., Hu, X., Qian, G., Ge, S., Zhang, J., 2013. The regulation of Toll-like receptor 2 by miR-143 suppresses the invasion and migration of a subset of human colorectal carcinoma cells. *Molecular cancer* 12, 77.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* 18, 3016-3027.
- Han, Y., Xu, G.-X., Lu, H., Yu, D.-H., Ren, Y., Wang, L., Huang, X.-H., Hou, W.-J., Wei, Z.-H., Chen, Y.-P., 2015. Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 7131.

- Hawrylowicz, C., O'Garra, A., 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 5, 271-283.
- He, X., Jing, Z., Cheng, G., 2014. MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *BioMed research international* 2014.
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., Tollervey, D., 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153, 654-665.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11, 506.
- Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., 2006. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 696-702.
- Hu, W., Collier, J., 2012. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell research* 22, 1322.
- Hu, X., Paik, P.K., Chen, J., Yamilina, A., Kockeritz, L., Lu, T.T., Woodgett, J.R., Ivashkiv, L.B., 2006. IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24, 563-574.
- Hutchins, A.P., Diez, D., Miranda-Saavedra, D., 2013. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in functional genomics* 12, 489-498.
- Jiang, L., Cheng, Z., Qiu, S., Que, Z., Bao, W., Jiang, C., Zou, F., Liu, P., Liu, J., 2012. Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly targeting IL-10 in Jurkat cells. *International immunopharmacology* 14, 217-223.
- Kailasapathy, K., Chin, J., 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology & Cell Biology* 78, 80-88.
- Kaji, R., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Nanno, M., Shida, K., 2010. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *Lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *J Immunol* 184, 3505-3513.
- Kataria, J., Li, N., Wynn, J.L., Neu, J., 2009. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition reviews* 67, 546-550.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11, 373-384.
- Kim, S.J., Gregersen, P.K., Diamond, B., 2013. Regulation of dendritic cell activation by microRNA let-7c and BLIMP1. *The Journal of clinical investigation* 123, 823.
- Kim, S.J., Schätzle, S., Ahmed, S.S., Haap, W., Jang, S.H., Gregersen, P.K., Georgiou, G., Diamond, B., 2017. Increased cathepsin S in Prdm1^{-/-}-dendritic cells alters the TFH cell repertoire and contributes to lupus. *Nature Immunology* 18, 1016-1024.
- Kishore, R., Tebo, J.M., Kolosov, M., Hamilton, T.A., 1999. Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *The Journal of Immunology* 162, 2457-2461.
- Knödler, A., Schmidt, S., Bringmann, A., Weck, M., Brauer, K., Holderried, T., Heine, A., Grünebach, F., Brossart, P., 2009. Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigen-presenting cells. *Leukemia* 23, 535-544.

- Konieczna, P., Schiavi, E., Ziegler, M., Groeger, D., Healy, S., Grant, R., O'Mahony, L., 2015. Human dendritic cell DC-SIGN and TLR-2 mediate complementary immune regulatory activities in response to *Lactobacillus rhamnosus* JB-1. *PLoS One* 10, e0120261.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lang, R., Patel, D., Morris, J.J., Rutschman, R.L., Murray, P.J., 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *The Journal of Immunology* 169, 2253-2263.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C., 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8, 171.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Li, Y., Kowdley, K.V., 2012. MicroRNAs in common human diseases. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 10, 246-253.
- Li, Y., Rong, J., Qin, J., He, J.-y., Chen, H.-g., Huang, S.-h., 2016. Micro RNA-98 interferes with expression interleukin-10 in peripheral B cells of patients with lung cancer. *Scientific reports* 6.
- Lin, K.-I., Kao, Y.-Y., Kuo, H.-K., Yang, W.-B., Chou, A., Lin, H.-H., Alice, L.Y., Wong, C.-H., 2006. Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor Blimp-1. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24111-24123.
- Liu, J., Cao, X., 2015. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity* 63, 1-12.
- Liu, J., Xu, J., Li, H., Sun, C., Yu, L., Li, Y., Shi, C., Zhou, X., Bian, X., Ping, Y., 2015. miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas. *Oncotarget* 6, 29129.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Ma, C., Liu, Y., He, L., 2009. MicroRNAs-powerful repression comes from small RNAs. *Science in China Series C: Life Sciences* 52, 323-330.
- Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics* 14, 447-459.
- MJ Mentzel, C., Skovgaard, K., Córdoba, S., H Uribe, J., K Busk, P., Cirera, S., 2014. Wet-lab tested microRNA assays for qPCR studies with SYBR® Green and DNA primers in pig tissues. *MicroRNA* 3, 174-188.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19, 683-765.
- Muylkens, B., Coupeau, D., Dambine, G., Trapp, S., Rasschaert, D., 2010. Marek's disease virus microRNA designated Mdv1-pre-miR-M4 targets both cellular and viral genes. *Archives of virology* 155, 1823-1837.
- Navarro, F., Lieberman, J., 2010. Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *The Journal of Immunology* 184, 5939-5947.
- Netea, M.G., Sutmoller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C.A., Van der Meer, J.W., van Krieken, J.H., Hartung, T., Adema, G., Kullberg, B.J., 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 172, 3712-3718.

- O'Garra, A., Barrat, F.J., Castro, A.G., Vicari, A., Hawrylowicz, C., 2008. Strategies for use of IL - 10 or its antagonists in human disease. *Immunological reviews* 223, 114-131.
- O'Garra, A., Vieira, P., 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature medicine* 10, 801-805.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
- Peter, M., 2010. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene* 29, 2161.
- Pink, R.C., Samuel, P., Massa, D., Caley, D.P., Brooks, S.A., Carter, D.R.F., 2015. The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology* 137, 143-151.
- Polikepahad, S., Knight, J.M., Naghavi, A.O., Opl, T., Creighton, C.J., Shaw, C., Benham, A.L., Kim, J., Soibam, B., Harris, R.A., 2010. Proinflammatory role for let-7 microRNAs in experimental asthma. *Journal of Biological Chemistry* 285, 30139-30149.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Riffo-Campos, Á.L., Riquelme, I., Brebi-Mieville, P., 2016. Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *International journal of molecular sciences* 17, 1987.
- Ritchie, W., Flamant, S., Rasko, J.E., 2009. Predicting microRNA targets and functions: traps for the unwary. *Nature methods* 6, 397-398.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* 14, 1902-1910.
- Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology* 10, 170.
- Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B.-J., van den Berg, A., 2010. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. *Rna* 16, 1087-1095.
- Staff, T.P.G., 2015. Correction: Bacterial Infection Drives the Expression Dynamics of microRNAs and Their isomiRs. *PLoS genetics* 11.
- Swaminathan, S., Suzuki, K., Seddiki, N., Kaplan, W., Cowley, M.J., Hood, C.L., Clancy, J.L., Murray, D.D., Mendez, C., Gelgor, L., Anderson, B., Roth, N., Cooper, D.A., Kelleher, A.D., 2012. Differential regulation of the Let-7 family of microRNAs in CD4+ T cells alters IL-10 expression. *J Immunol* 188, 6238-6246.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., Baltimore, D., 2006. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12481-12486.
- Tohno, M., Kitazawa, H., Shimosato, T., Matsumoto, M., Katoh, S., Kawai, Y., Saito, T., 2005. A swine toll-like receptor 2-expressing transfectant as a potential primary screening system for immunobiotic microorganisms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 44, 283-288.
- Vejnar, C.E., Zdobnov, E.M., 2012. MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic acids research* 40, 11673-11683.
- Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O'Carroll, D., Tarakhovskiy, A., Ahn, N.G., Yi, R., 2012. Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes & development* 26, 693-704.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228.
- Xie, N., Cui, H., Banerjee, S., Tan, Z., Salomao, R., Fu, M., Abraham, E., Thannickal, V.J., Liu, G., 2014. miR-27a regulates inflammatory response of macrophages by targeting IL-10. *The Journal of Immunology* 193, 327-334.

- Xie, Y.-F., Shu, R., Jiang, S.-Y., Liu, D.-L., Ni, J., Zhang, X.-L., 2013. MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *Journal of Inflammation* 10, 20.
- Xu, C., Ren, G., Cao, G., Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Du, L., Han, X., Jiang, M., Yang, Q., 2013. miR-155 regulates immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by targeting TAK1-binding protein 2. *Journal of Biological Chemistry* 288, 11074-11079.
- Xu, G., Fewell, C., Taylor, C., Deng, N., Hedges, D., Wang, X., Zhang, K., Lacey, M., Zhang, H., Yin, Q., 2010. Transcriptome and targetome analysis in MIR155 expressing cells using RNA-seq. *Rna* 16, 1610-1622.
- Xue, X., Feng, T., Yao, S., Wolf, K.J., Liu, C.G., Liu, X., Elson, C.O., Cong, Y., 2011. Microbiota downregulates dendritic cell expression of miR-10a, which targets IL-12/IL-23p40. *J Immunol* 187, 5879-5886.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.
- Ying, S.-Y., Lin, S.-L., 2006. Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs). *Journal of biomedical science* 13, 5-15.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., Frokiaer, H., 2008. Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology* 124, 489-502.