



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

«Perfil de microRNA inducido por los productos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* (TcES) en macrófagos»

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DIANA LETICIA MARTÍNEZ SAUCEDO

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

FACULTAD DE MEDICINA

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Los Reyes Iztacala, Estado de México,
México.

Junio, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgó para mis estudios de doctorado (CVU: 468255; becario: 289850).

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés.

Al Dr. Abhay R. Satoskar y Dr. César Terrazas.

Al Dr. Santiago Partida Sánchez, Dr. Frank Robledo Ávila y Dr. Juan de Dios Ruíz Rosado por su apoyo para concluir este proyecto y su ayuda en la redacción del artículo.

A los miembros del jurado del examen de grado: Dra. Yolanda Irasema Chirino, Dr. Juan Miranda, Dra. Norma Angélica Moreno y Dr. Jorge Morales Montor por sus valiosas observaciones.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi papá y mamá, que siempre nos han dan todo lo que pueden, incluyendo su apoyo y motivación para estudiar. Jamás podremos terminar de agradecer lo que han hecho por nosotras.

A mi mamá Tana, que me ha enseñado de amor incondicional, trabajo duro y de verdadera vocación, altruismo y amor a los demás.

A Nuria por ser mi cómplice durante casi toda mi vida. Estoy orgullosa de la mujer tan increíble y fuerte que eres. Gracias por inspirarme siempre.

A Saúl por el amor, apoyo, comprensión; por creer en mí y motivarme en los momentos más oscuros; por aceptarme como soy, pero motivarme para crecer juntos y ser mejores.

A Blanca, por todas las horas de audio y lectura que me has dedicado; por siempre tener tiempo y espacio para mí. Tu apoyo ha sido fundamental en mi vida.

A Yiyo y Yiya, por su amor.

A Audrey y Hachi.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme tantas oportunidades profesionales y personales.

A Abril y Germán.

A Juan, Frank y Giovanna por apoyo y amistad.

A todas las personas y experiencias que me han llevado a ser la que soy y seré.

DEDICATORIAS

A todos los seres que traen luz y amor a mi vida cuando llega la oscuridad.

A todas las mujeres que lucharon y luchan por los derechos de las demás.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Taenia crassiceps</i>	1
1.1.1 La respuesta inmune a <i>T. crassiceps</i>	1
1.1.2 Los productos excretados/secretados de <i>T. crassiceps</i> (TcES).....	5
1.2 LOS MACRÓFAGOS.....	6
1.2.1 Los macrófagos clásicamente activados (M1).....	7
1.2.2 Los macrófagos alternativamente activados (M2)	10
1.3 Los microRNA.....	12
1.3.1 Biogénesis de los microRNA	13
1.3.2 La función de los microRNA en el sistema inmune	17
1.3.3 Los microRNA y macrófagos	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. LINEAMIENTOS ÉTICOS	24
5.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	24
5.3. CULTIVO DE <i>Taenia crassiceps</i> Y OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN (TcES)	24
5.4. OBTENCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA (MDMO)	25
5.5. ESTÍMULO DE MDMO	25
5.6. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	27
5.7. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CITOCINAS	28
5.8. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	28
5.9. EXTRACCIÓN Y CALIDAD DE LOS RNA.....	28

5.10. ARREGLOS DE RNAm Y microRNA	29
5.11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	30
5.12. RT-qPCR EN TIEMPO REAL	30
5.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 LOS TcES REDUCEN LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS ASOCIADAS A INFLAMACIÓN EN MACRÓFAGOS EXPUESTOS A LPS	32
6.2. LA ACUMULACIÓN DE RNAm ASOCIADOS A INFLAMACIÓN ES SIMILAR ENTRE $M_{TcES+LPS}$ Y M_{LPS}	37
6.3 LOS TcES MODIFICAN EL PERFIL DE LOS MICRORNA EN LOS MDMO ESTIMULADOS CON LPS.....	43
7. DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIONES	60
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61
10. ANEXOS	74
10.1 ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN DERIVADO DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO.....	74
10.2 <i>PRIMERS</i> DE RNAm Y microRNA.....	100
10.3 RNAm CON MAYOR ACUMULACIÓN EN M_{LPS}	101
10.4 RNAm CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{TcES}	103
10.5 RNAm CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN $M_{TcES+LPS}$	104
10.6 RNAm PRODUCIDOS DIFERENCIALMENTE ENTRE $M_{TcES+LPS}$ Y M_{LPS}	107
10.7 microRNA CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{LPS}	108
10.8 microRNA CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{TcES}	111
10.9 microRNA CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN $M_{TcES+LPS}$	112
10.10 microRNA PRODUCIDOS DIFERENCIALMENTE ENTRE $M_{TcES+LPS}$ Y M_{LPS}	114
10.11 ANÁLISIS DE VÍAS KEGG	116
10.12 PROCESOS BIOLÓGICOS DE TÉRMINOS GO	119

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>	2
Figura 2: Cinética de la respuesta inmune durante la infección con <i>T. crassiceps</i> en peritoneo de ratonas BALB/c.....	3
Figura 3: Modelo de activación de macrófagos M1 y M2.....	7
Figura 4: Metabolismo de arginina por NOS2 y ARG1 en la polarización de macrófagos M1 y M2.....	8
Figura 5: Principales vías de señalización en los macrófagos M1.....	9
Figura 6: Principales vías de señalización en los macrófagos M2.....	12
Figura 7: Vía canónica de biogénesis de los microRNA.....	15
Figura 8: Las células derivadas de médula ósea tienen moléculas de membrana características de macrófagos.....	26
Figura 9: Diagrama de flujo del diseño experimental general.....	26
Figura 10: Los TcES disminuyen la producción de citocinas asociadas a inflamación en macrófagos estimulados con LPS.....	33
Figura 11: La acumulación de RNAm de las citocinas no coincide con su producción a las 4 h postestímulo.....	33
Figura 12: La acumulación de RNAm de las citocinas no coincide con su producción a las 24 h postestímulo.....	34
Figura 13: Los TcES inhiben la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS.....	35
Figura 14: Los TcES no alteran los niveles de los RNAm <i>Arg1</i> , pero sí del RNAm <i>Nos2</i> a las 24 h postestímulo.....	36
Figura 15: Los TcES no modifican los niveles de las enzimas NOS2 y ARG1 en macrófagos.....	36
Figura 16: Top 25 de RNAm aumentados en MDMO.....	37
Figura 17: Validación e identificación de RNAm en los MDMO estimulados.....	42
Figura 18: Top 25 de microRNA aumentados en MDMO.....	43
Figura 19: Top 10 de procesos biológicos de las anotaciones GO en M _{TcES} , M _{TcES+LPS} y M _{LPS} a las 4 h postestímulos.....	46
Figura 20: Top 10 de procesos biológicos de las anotaciones GO en M _{TcES} , M _{TcES+LPS} y M _{LPS} a las 24 h postestímulos.....	47
Figura 21: Top 10 de vías de señalización KEGG en M _{TcES} , M _{TcES+LPS} y M _{LPS} a las 4 h postestímulos.....	49
Figura 22: Top 10 de vías de señalización KEGG en M _{TcES} , M _{TcES+LPS} y M _{LPS} a las 24 h postestímulos.....	50
Figura 23: Validación e identificación de microRNA en los MDMO estimulados.....	51
Figura 24: Modelo hipotético de la vía de señalización inducida macrófagos M _{TcES+LPS}	58
Tabla 1: Top 10 de RNAm modificados entre los M _{TcES} , M _{TcES+LPS} o M _{LPS} a las 4 h postestímulo.....	38
Tabla 2. Top 10 de RNAm modificados entre los M _{TcES} , M _{TcES+LPS} o M _{LPS} a las 24 h postestímulo.....	39
Tabla 3. RNAm comunes entre los M _{TcES} , M _{TcES+LPS} o M _{LPS} a las 4 y 24 h postestímulo.....	40
Tabla 4. Top 10 de microRNA modificados entre los MDMO estimulados por M _{TcES} , M _{TcES+LPS} o M _{LPS} a las 4 y 24 h postestímulo.....	44
Tabla 5. microRNA comunes entre los MDMO estimulados por M _{TcES} , M _{TcES+LPS} o M _{LPS} a las 4 y 24 h postestímulo.....	45

ABREVIATURAS

° C	Grados centígrados.	PHAX	Adaptador fosforilado para la exportación del RNA.	kDa	Kilo Dalton.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.	Fc	Región del fragmento cristalizante.	KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto.
AGO	Proteína Argonauta.	FC	Veces de cambios.	KLF	Factor Kruppel-like.
AKT	Proteína quinasa B, también conocida como PKB.	FIZZ1	Found in inflammatory zone.	LPS	Lipopolisacáridos de <i>Escherichia coli</i> .
ARG1	Arginasa 1.	g	Gravedades.	M₀	MDMO estimulados con PBS o DMEM.
RNA	Ácido ribonucleico.	GEO	Gene Expression Omnibus.	M1	Macrófagos clásicamente activados.
RNA Pol II	RNA polimerasa II.	GM-CSF	Factor estimulado de colonias de granulocitos y macrófagos.	M2	Macrófagos alternativamente activados.
RNA^m	Ácido ribonucleico mensajero.	GO	Ontología de genes.	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases.
CBC	Complejo de unión a la caperuza.	h	Horas.	M-CSF	Factor de crecimiento de macrófagos.
CSF	Factor estimulador de colonias.	HNP1	Human neutrophil peptide 1.	MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea.
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin.	IFN$\alpha\beta$	Receptor interferón $\alpha\beta$.	M_{IL-4}	MDMO estimulados con IL-4 recombinante (50 ng/ml).
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8.	IFNγ	Interferón gama.	M_{IL-4+TcES}	MDMO estimulados con IL-4 y TcES.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium.	IKKβ	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit β .	Min	Minuto.
dNTPs	Deoxinucleósido trifosfato.	IL-...	Interleucina.	miRISC	microRNA and RNA-induced silencing complex.
EAE	Encefalomiелitis autoimmune experimental.	IL-4Rα	Cadena alfa del receptor de interleucina 4.	M_{LPS}	MDMO estimulados con LPS (1 μ g/ml).
ELISA	Ensayo por absorción inmune ligado a enzimas.	IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1.	MR	Receptor de manosa.
ERK	Extracellular signal-regulated kinases.	IRF1-9	Interferon regulatory factor.	M_{TcES}	MDMO estimulados con TcES (25 ng/ml).
ES	Productos excretados/secretados.	IRS2	Insulin receptor substrate 2.	M_{TcES+LPS}	MDMO estimulados con TcES y LPS.
		JAK	Janus kinase.		
		JNK	Quinasas c-Jun N-terminal.		

mTORC Mammalian target of rapamycin complex 1.	PI3K Fosfoinositol 3-quinasa o fosfoinositida-3-quinasa.	snRNA RNA pequeños nucleares.
MyD88 Myeloid differentiation primary response 88.	PIP2 Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate.	SOCS1 Suppressor of cytokine signalling 1.
NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica.	PIP3 Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate.	SSFE Solución salina estéril.
NF-κB Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas.	PPARγ Peroxisome proliferator activated receptor γ .	STAT Traductor de señales y activador de la transcripción.
NO Óxido nítrico.	pre-miRNA Precursor de microRNA.	TcES Productos de excreción/secreción de <i>Taenia crassiceps</i> .
NOS2 Óxido nítrico sintasa inducible.	pri-miRNA microRNA primario.	TLR Receptores tipo Toll.
nt Nucleótidos.	RISC RNA-induced silencing complex.	TNFα Factor de necrosis tumoral α .
PAMP Patrones moleculares asociados a patógenos	rpm Revoluciones por minuto.	TRAF TNF receptor associated factor.
PBS Phosphate buffered saline.	RT-qPCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real.	TRBP TAR RNA binding protein.
PDCD4 Proteína de muerte celular programada 4.	s Segundos.	TRIF TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β .
PD-L Programmed death ligand.	SHIP1 Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1.	TYK Tyrosine kinase.
		UTR Región no traducida.
		YM1 Chitinase-like protein 3, β -N-acetylhexosaminidas

RESUMEN

Los helmintos parásitos establecen infecciones crónicas en su hospedador a través de sus productos excretados/secretados (ES), con los cuales disminuyen respuestas inflamatorias que podrían eliminarlos directa o indirectamente. De igual forma, los ES de *Taenia crassiceps* (TcES) disminuyen la respuesta inflamatoria en modelos murinos de enfermedades autoinmunes por medio del reclutamiento de macrófagos alternativamente activados (M2). En años recientes, los microRNA han demostrado ser moléculas esenciales para la polarización de los macrófagos, por lo que estamos interesados en estudiar los efectos de los TcES sobre el perfil de microRNA en macrófagos inflamatorios (M1) *in vitro*. En este trabajo, se reportan cambios en el perfil de expresión de microRNA de M1 expuestos a los TcES; estos cambios son el aumento de microRNA (≥ 2 veces) cuyos blancos son RNAm asociados a vías inflamatorias (miR-125a-5p, miR-484 y miR-762) y la disminución (≤ 2 veces) de los que favorecen el establecimiento de vías inflamación (miR-155-5p). Además, en línea con estos resultados, las citocinas asociadas a inflamación se redujeron (≥ 50 %): IL-6, IL-12 y TNF α ; mientras que la asociada a regulación de la respuesta inmune aumentó (≤ 50 %): IL-10, en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) M1. Lo anterior, ocurre sin cambios significativos en la acumulación de RNAm asociados a inflamación entre los MDMO expuestos solo a LPS y los expuestos a LPS y TcES. Además, los TcES inhibieron la producción del NO, sin inducir cambios en la producción de las enzimas NOS2 o ARG1. Los resultados de estos experimentos muestran que los TcES modifican el perfil de los microRNA como mecanismo postranscripcional para regular negativamente la respuesta inflamatoria de los macrófagos.

ABSTRACT

Helminth parasites modulate immune responses in their host to prevent their elimination and to establish chronic infections. Our previous studies indicate that *Taenia crassiceps* -excreted/secreted antigens (TcES) downregulate inflammatory responses in rodent models of autoimmune diseases, by promoting the generation of alternatively activated-like macrophages (M2) in vivo. However, the molecular mechanisms triggered by TcES that modulate macrophage polarization and inflammatory response remain unclear. Here, we found that, while TcES reduced the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, and TNF- α), they increased the release of IL-10 in LPS-induced bone marrow-derived macrophages (BMDM). However, TcES alone or in combination with LPS or IL-4 failed to increase the production of the canonical M1 or M2 markers in BMDM. To further define the anti-inflammatory effect of TcES in the response of LPS-stimulated macrophages, we performed transcriptomic array analyses of mRNA and microRNA to evaluate their levels. Although the addition of TcES to LPS-stimulated BMDM induced modest changes in the inflammatory mRNA profile, it induced the production of mRNAs associated with the activation of different receptors, phagocytosis, and M2-like phenotype. Moreover, we found that TcES induced upregulation of specific microRNAs, including miR-125a-5p, miR-762, and miR-484, which are predicted to target canonical inflammatory molecules and pathways in LPS-induced BMDM. These results suggest that TcES can modulate proinflammatory responses in macrophages by inducing regulatory posttranscriptional mechanisms and hence reduce detrimental outcomes in hosts running with inflammatory diseases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps es un helminto parásito, cuyo ciclo de vida ocurre en cánidos (hospedadores definitivos) y roedores (hospedadores intermedios). En los cánidos, el adulto de *T. crassiceps* se desarrolla y reproduce sexualmente en intestino, por lo que los huevecillos son liberados a través de las heces y contaminan el suelo. Los roedores ingieren los huevecillos, de los cuales eclosiona la larva (cisticerco) para desarrollarse subcutáneamente o en cavidades pleurales y peritoneales (Figura 1). El ciclo de vida se completa cuando el cánido ingiere al roedor infectado con los cisticercos, los cuales viajan a intestino y se desarrolla el adulto. Los cisticercos, también llamados metacestodos, pueden reproducirse asexualmente a través de gemación, lo cual facilita su mantenimiento en cavidad peritoneal de ratones en modelos experimentales^{1,2}.

1.1.1 La respuesta inmune a *T. crassiceps*

Para cultivar a *T. crassiceps* en el laboratorio, se inoculan 20 cisticercos en cavidad peritoneal de ratonas cepa BALB/c para que se reproduzcan asexualmente durante 8 semanas (Detalles en Materiales y métodos, sección «Cultivo de *Taenia crassiceps* y obtención de productos de excreción/secreción (TcES)»). Lo anterior, ha permitido estudiar la respuesta inmune que el helminto induce en su hospedador³. Entre las primeras observaciones, fue que las hormonas sexuales funcionan como mediadores de resistencia y susceptibilidad durante la infección con *T. crassiceps*, ya que a las hembras, los estrógenos las hacen susceptibles, mientras que a los machos, los andrógenos los hacen resistentes⁴.

Ciclo de vida de *T. crassiceps*

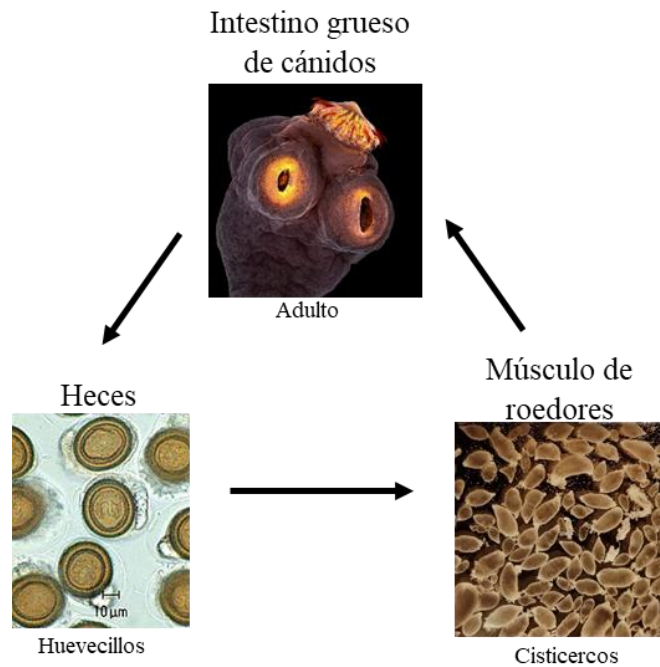


Figura 1: Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. El adulto de *T. crassiceps* se desarrolla en cánidos, donde se reproduce sexualmente y libera sus huevecillos a través de heces; estos contaminan el suelo y son ingeridos por roedores. Los huevecillos eclosionan, viajan a músculo y desarrollan la etapa larvaria o cisticerco. El ciclo de vida se completa cuando los roedores son ingeridos por los cánidos. Imagen del escólex de *Taenia* spp (microscopio confocal 200x) pertenece a Teresa Zgoda del Rochester Institute of Technology (RIT), Rochester, Nueva York, EE. UU.

Durante las primeras 5 semanas de infección (etapa aguda), *T. crassiceps* provoca una respuesta de inflamatoria de tipo T_H1 , caracterizada por la producción de moléculas como $IFN\gamma$, $IgG2a$ y especies reactivas de oxígeno. Este microambiente inducen perfiles inflamatorios en las células inmunitarias, por ejemplo, los macrófagos se activan de manera clásica o M1, produciendo la enzima NOS2 para la síntesis de NO (óxido nítrico) (Figura 2)⁵. Las moléculas producidas durante esta respuesta dañan al helminto, lo que limita su crecimiento y reproducción. Sin embargo, no lo eliminan, por lo que tanto la infección como la respuesta inflamatoria se prolongan durante varias semanas, dañando los tejidos del hospedador cercanos a *T. crassiceps*⁵⁻⁷.

Por lo anterior, a partir de las 6 semanas posinfección con *T. crassiceps* (etapa crónica), la respuesta del hospedador se polariza hacia una de tipo T_H2 , caracterizada por la producción de moléculas como las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, prostaglandina E2 (PGE_2), IgG1 e IgE, para contrarrestar la inflamación y repara los daños provocados en los tejidos por la inflamación crónica. Este microambiente induce poblaciones como los macrófagos alternativamente activados o M2, que producen a la enzima ARG1 para la síntesis de prolina y poliaminas, necesarias para la reparación de tejidos (Figura 2)⁵. Además, debido a la coevolución entre ambas especies, la respuesta de tipo T_H2 para *T. crassiceps* implica su sobrevivencia, ya que se suprime la producción de las moléculas que dañaban sus tejidos, por lo que este helminto encuentra un ambiente favorable y se reproduce asexualmente, aumentando la carga parasitaria^{5,8-11}.

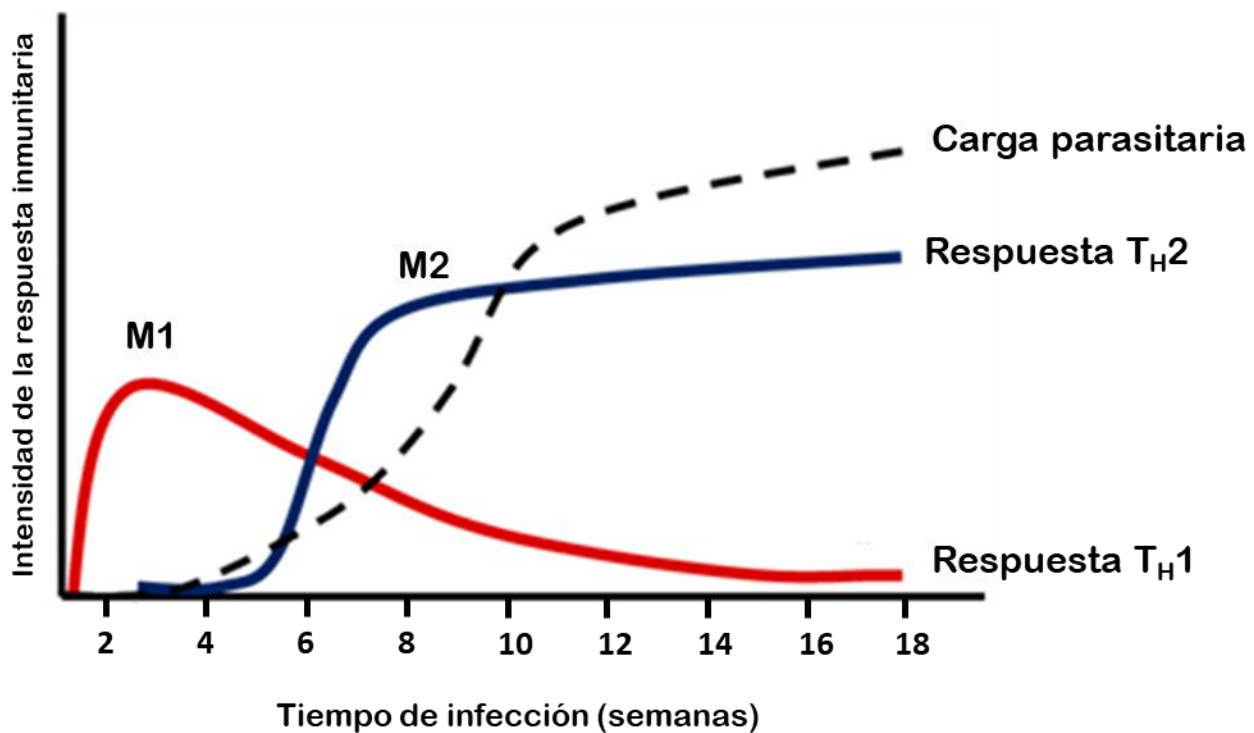


Figura 2: Cinética de la respuesta inmune durante la infección con *T. crassiceps* en peritoneo de ratonas BALB/c. Durante las primeras 5 semanas, la respuesta inmune es de tipo T_H1 , por lo que se producen citocinas y moléculas inflamatorias características como IL-12, IFN γ , TNF α y NO, y los macrófagos se activan clásicamente (M1). A partir de la semana 6, la respuesta inmune se polariza a una de tipo T_H2 , produciendo citocinas y moléculas antiinflamatorias como IL-4, IL10, IL-13, PGE_2 , prolina y poliaminas, y los macrófagos se activan alternativamente (M2), lo que en conjunto aumenta la carga parasitaria. Imagen modificada de Reyes, JL & Terrazas LI, (2007)¹².

En la últimas décadas, se han desarrollado modelos experimentales para estudiar los efectos de las infecciones por helmintos como terapia contra enfermedades autoinmunes o inflamatorias, tales como la esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias del intestino, artritis reumatoide y diabetes tipo 1¹³⁻¹⁵. Durante estas enfermedades, el sistema inmune reconoce a antígenos propios o inocuos como extraños y nocivos, por lo que monta una respuesta inflamatoria contra ellos, provocando graves daños en el hospedador. En los modelos experimentales, las moléculas y células de la respuesta tipo T_H2 inducidas por *T. crassiceps* y otros helmintos contrarrestan a las moléculas y células inflamatorias, con lo cual disminuyen los signos de las enfermedades y se reparan los tejidos dañados¹⁶⁻²⁴. Aunque estos modelos no reflejan completamente la patología de las enfermedades humanas, sí han permitido obtener información para utilizarlos de forma segura y con eficiencia en los humanos²⁵.

Una de las poblaciones celulares más prometedoras para uso terapéutico, son los macrófagos M2. Estos se caracterizan por producir altos niveles de Arginasa-1 (ARG1), FIZZ1, YM1, IL-10 e IL-6; así como por inhibir la proliferación de linfocitos T CD90⁺ previamente activados con αCD3 a través de las moléculas de membrana PD-L1 y PD-L2. Durante la infección con *T. crassiceps*, son reclutados a cavidad peritoneal^{11,26}. Recientemente, macrófagos M2 (PD-L1⁺PD-L2⁺) reclutados por la infección con *T. crassiceps* se recuperaron, aislaron e inocularon en ratones con encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), en los que se retrasó la aparición de síntomas de la enfermedad o se redujo la incapacidad clínica e incidencia, demostrando que los macrófagos M2 son cruciales para regular al sistema inmune durante enfermedades autoinmunes²⁷.

El tratamiento de enfermedades autoinmunes a través de la terapia con diversos helmintos ha mostrado su efectividad tanto en modelos experimentales como en pruebas clínicas²⁸. Sin embargo, los riesgos de utilizar parásitos vivos para el tratamiento de pacientes preocupan a algunos investigadores²⁸. Por lo anterior, la obtención y utilización de los productos de excreción/secreción (ES) de los helmintos es una alternativa segura, ya que los efectos en la regulación del sistema inmune son idénticos a los de las infecciones.

1.1.2 Los productos excretados/secretados de *T. crassiceps* (TcES)

Los ES son las moléculas producidas por los helmintos para sobrevivir, propagarse y evadir al sistema inmune del hospedador. Son secretados a través de las aperturas orales o de la superficie de su cuerpo, y están compuestos por una mezcla de proteínas, glicoproteínas y otras moléculas de bajo peso molecular^{29,30}. En los últimos años, se ha reportado que el tratamiento experimental y clínico de enfermedades autoinmunes con los ES tiene efectos iguales a los de las infecciones: los síntomas, curso clínico e inflamación disminuyen, mientras que aumenta la respuesta de tipo T_H2, con citocinas como IL-4 e IL-10 y el establecimiento de poblaciones celulares reguladoras³¹⁻³⁷.

En el caso de *T. crassiceps*, se utilizan los productos de excreción/secretación (TcES) mayores a 50 kDa³⁸. En los modelos murinos de EAE y diabetes tipo 1, la inyección en cavidad peritoneal de los TcES disminuye los signos y la incidencia de las enfermedades a través del control de las células y citocinas inflamatorias por medio de una respuesta tipo T_H2, altas cantidades de IL-10 y el reclutamiento de macrófagos M2^{39,40}. Lo anterior, demuestra que los TcES tienen los mismos efectos que la infección con *T. crassiceps* en modelos autoinmunes.

Hasta el momento, conocemos poco de los efectos directos de los TcES sobre las células inmunes. Sabemos que en células dendríticas, los TcES inhiben la maduración y respuesta a lipopolisacáridos (LPS) porque reducen la producción de moléculas de membrana como CD80 y CD86; así como de las citocinas inflamatorias IL-1 β , TNF α , IL-12 e IL-6^{38,41}. Por otra parte, los macrófagos cultivados durante 3 días con los TcES no responden al estímulo con IFN γ , ya que SHP1 y SOCS1 impiden la fosforilación de STAT1, demostrando que los TcES impiden que los macrófagos respondan a estímulos inflamatorios⁴². No obstante, desconocemos si los TcES son suficientes para que los macrófagos adquieran un fenotipo de M2.

1.2 LOS MACRÓFAGOS

En 1908, Elie Metchnikoff describió a unas células fagocíticas que identificó como la primera línea de defensa contra las infecciones en los organismos. Para 1924, recibieron el nombre de «macrófagos» y en 1969, los macrófagos fueron identificados como parte del sistema fagocítico mononuclear⁴³. Los macrófagos se desarrollan en médula ósea a partir de células madre, las cuales se diferencian en unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CFU, por sus siglas en inglés), después en monoblastos, promonocitos y, finalmente, en monocitos, a través de los estímulos con multi-CSF, IL-3, GM-CSF y M-CSF, respectivamente. Ya como monocitos se liberan al torrente sanguíneo y viajan a diferentes tejidos, según el cual, junto con el microambiente, serán las características que el macrófago adquirirá. Por ejemplo: en hígado, se conocen como células de Kupffer; en piel, células de Langerhans; en hueso, osteoblastos; y en sistema nervioso central, microglía⁴⁴⁻⁴⁶.

Los macrófagos son células inmunes cuyas funciones incluyen la respuesta primaria a patógenos, inflamación, resolución de la inflamación, mantenimiento de homeostasis y reparación de los tejidos^{47,48}. Al ser parte del sistema inmune, cuentan con una amplia variedad de receptores en su superficie como los TLR (receptores tipo Toll, por sus siglas en inglés), receptores tipo lectina y *scavenger*, los cuales les permiten reconocer a los patógenos por sus PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos, por siglas en inglés). La señalización a través de los receptores modifica las funciones de los macrófagos al inducir, directa o indirectamente, patrones de expresión de genes y, por tanto, de proteínas⁴⁹⁻⁵¹.

Durante las últimas décadas, diversos perfiles de activación de los macrófagos se han descrito, dados por las interacciones con el microambiente y otros eventos multifactoriales. Entre los primeros descritos, están los clásicamente activados (M1) y los alternativamente activados (M2) (Figura 3). Los M1 se diferencian al reconocer PAMP de organismos patógenos y en respuesta se producen citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF α , y la enzima NOS2, necesaria para la producción de óxido nítrico (NO). De esta forma, los macrófagos M1 adquieren actividad antimicrobiana. Por otra parte, los macrófagos M2 se activan por el

estímulo de IL-4 e IL-13 y en respuesta se producen citocinas asociadas a la regulación negativa del sistema inmune como IL-10 y la enzima ARG1, necesaria para la producción de prolina y poliaminas que participan en la reparación del tejido (Figura 4). Los macrófagos M2 antagonizan con los macrófagos M1⁵²⁻⁵⁴

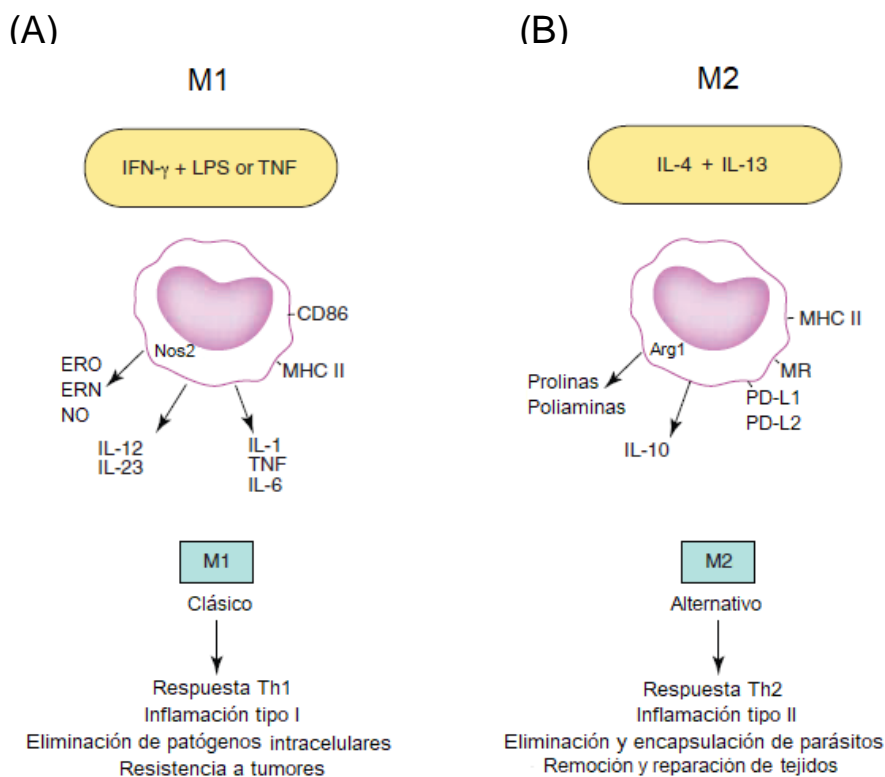


Figura 3. Modelo de activación de macrófagos M1 y M2. (A) Los macrófagos M1 son inducidos por IFN γ , LPS o TNF α con lo cual se activan vías de señalización para la producción de moléculas inflamatorias como el NO, IL-12, IL-23 y TNF α con lo cual se eliminan los patógenos intracelulares. (B) Los macrófagos M2 son inducidos por IL-4 o IL-13 con lo cual se activan vías de señalización antiinflamatorias para producir moléculas reguladoras y reparadoras como IL-10, prolina, poliaminas, PD-L1 y PD-L2. Modificada de Martínez FO y Gordon S (2014)⁵⁴.

1.2.1 Los macrófagos clásicamente activados (M1)

La activación clásica de los macrófagos (M1) ocurre cuando entran en contacto con IFN γ y antígenos de los organismos patógenos, como los LPS de bacterias Gram negativas. Entonces, los macrófagos

desarrollan una respuesta inflamatoria para eliminar a los patógenos intracelulares mediante la producción de citocinas como interferones tipo I (IFN α e IFN β), IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23 y TNF α ; quimiocinas como CXCL1-3, CXCL5, CXCL8-10; especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, y NO⁵⁴⁻⁵⁶. Una de las características principales y definitorias de estos macrófagos es el incremento en la producción de la enzima NOS2, la cual metaboliza a la L-arginina para producir NO (Figura 4)⁵⁷.

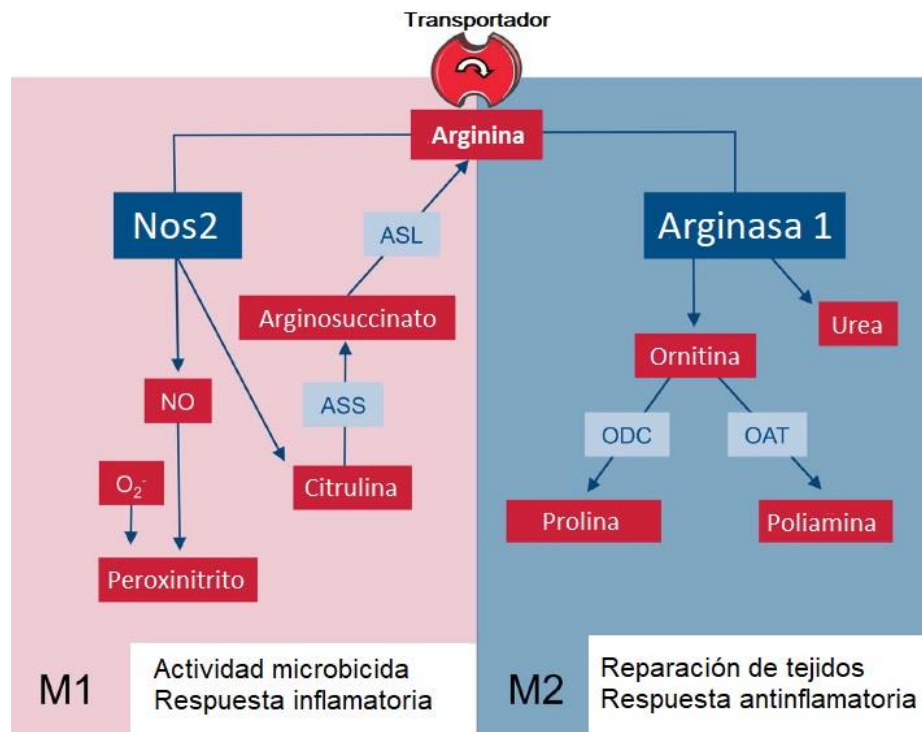


Figura 4. Metabolismo de arginina por NOS2 y ARG1 en la polarización de macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 procesan la L-arginina por medio de la enzima NOS2, produciendo como producto intermedio NO; mientras que los macrófagos M2 procesan la L-arginina utilizando la enzima ARG1, produciendo prolina y poliaminas para reparación del tejido. Abreviaturas: ASL, arginino succinato liasa; ASS, arginino succinato sintasa; OAT, ornitina aminotransferasa; ODC, ornitino decarboxilasa. Modificada de Rath, M. *et al.* (2014)⁵⁷.

Como ya mencionamos, los macrófagos tienen una amplia gama de receptores de membrana para reconocer a los PAMP. El receptor TLR4, parte de la familia TLR, reconoce a los LPS, por lo que se activan miembros de la vía de las MAPK (Mitogen-activated protein kinases), como a ERK-1 y ERK-2, los cuales

participan en la producción de IL-1 β y TNF α ⁵⁸. Además, se activan los adaptadores MyD88 y TRIF. La vía de señalización a través de MyD88 activa una cascada de quinasas que incluye a IRAK4, TRAF6 e IKK β , y culmina con la activación de NF- κ B (factor nuclear κ B); este factor es crítico para la respuesta inflamatoria en macrófagos puesto que transcribe a múltiples genes inflamatorios que incluyen a los de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF α (Figura 5)^{59,60}.

M1

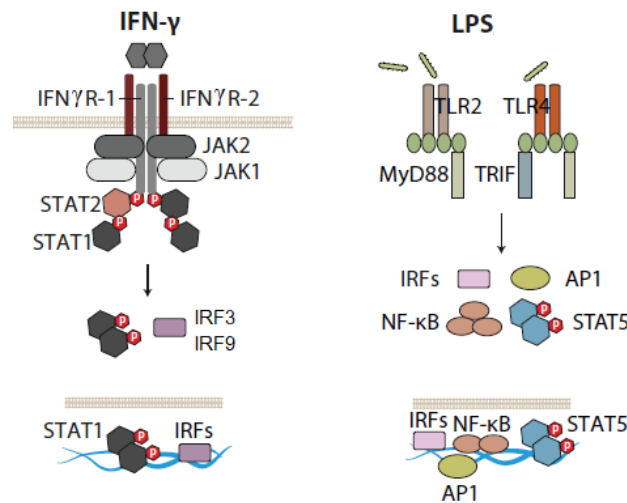


Figura 5. Principales vías de señalización en los macrófagos M1. IFN γ y LPS son los ejemplos de los principales estímulos necesarios para la inducción de macrófagos M1 Como se explica en el texto NF- κ B, STAT1, IRF3, IRF9 y AP-1 son los principales mediadores de la activación M1. Modificado de Martínez FO y Gordon S, 2014⁵⁴.

Paralelamente, la señalización a través TRIF activa al factor de transcripción IRF3 (Interferon-responsive factor), el cual transcribe a los IFN tipo I que funcionan de manera autocrina, al unirse a su receptor: IFN α / β R. Lo anterior, provoca que STAT1 y STAT2 se fosforilen y formen un heterodímero que transloca a núcleo, donde recluta a IRF9, formando un heterotrímero, que se une en promotores de genes estimulados por IFN^{61,62}. Los IRF son reguladores de la activación de los macrófagos⁶³. Además de IRF9 e IRF3, IRF5 también es activado río abajo de MyD88 y es necesario para la producción de los RNAm *Il6*, *Il12* y *Tnf* (Figura 5)^{64,65}.

Otra de las vías de activación de macrófagos M1 es por el estímulo con IFN γ , el cual al unirse a su receptor activa a JAK1 y JAK2, los cuales fosforilan a STAT1 que forma un homodímero y transloca al núcleo para la transcribir a los RNAm *Nos2* e *Il12*. STAT1 es un factor de transcripción esencial para los macrófagos M1^{61,66}. Simultáneamente, IFN γ activa a las MAPK: p38, ERK-1, ERK-2 y JNK-1, los cuales contribuyen con la producción de RNAm como *Nos2*, *Tnf*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* y otros asociados a la presentación de antígenos⁶⁷. Curiosamente, la vía de JNK/AP1 se sobrepone con la de NF- κ B, incluyendo estímulos de activación y genes activados río abajo, sugiriendo la cooperación entre ambas vías y asegurarse de que ocurra la activación a M1⁶⁸.

Por último, el establecimiento de los macrófagos M1 requiere de la inhibición de las vías asociadas a macrófagos M2. Como ejemplo, el complejo COT/TPL2, parte de las MAPK, controla la fosforilación de la vía PI3K-AKT-mTOR, la cual promueve la activación a M2 y restringe la inflamación al regular a los RNAm de TNF α , COX2 y CXCL-1⁶⁹. Otro ejemplo es la fosfatasa SHIP, regulador negativo de la vía PI3K, por lo que también favorece el establecimiento de los macrófagos M1 y suprime a los macrófagos M2⁷⁰.

1.2.2 Los macrófagos alternativamente activados (M2)

Los macrófagos se activan alternativamente (M2) al entrar en contacto con las citocinas IL-4 o IL-13, con lo cual, contribuyen a una respuesta antiinflamatoria, remueven y reparan el tejido dañado, y contienen o expulsan a los parásitos extracelulares⁴⁹. Lo anterior ocurre por la producción de IL-10, dectina 1, receptor de manosa (MR), receptor *scavenger* A, receptor *scavenger* B-1, CD163, DC-SIGN, CCR2, CXCR1, CXCR2, YM1 y FIZZ1⁷¹⁻⁷³. Una de las características principales y definitorias de estos macrófagos es el incremento en la producción de la enzima ARG1, la cual metaboliza a la L-arginina para producir prolina y poliaminas, necesarias para la reparación de tejidos (Figura 4). La ARG1 compite con NOS2 por la L-arginina^{74,75}.

La IL-4R α (Cadena α del receptor de IL-4) es parte del receptor de la IL-4 e IL-13, las cuales al unirse a su receptor activan a JAK1 y JAK2 o a JAK1 y TYK2, respectivamente. En ambos casos, la señalización río abajo activa a STAT6, factor de transcripción fundamental para el perfil M2, que forma un homodímero, transloca al núcleo, recluta a IRF4 y activa a los promotores de los genes de ARG1, MR, FIZZ1, YM1, entre otros (Figura 6)^{61,76-78}. Además, la unión a la IL-4R α también induce la fosforilación de IRS2 que activa a PI3K, cuya vía participa en la activación M2 de los macrófagos⁷⁹.

La vía de PI3K/AKT se activa a través de los receptores Fc. Una vez activada, la PI3K tipo I fosforila a PIP2 para generar PIP3, el cual recluta a AKT y a mTORC2, facilitando la activación de AKT por mTORC2. Una vez activada, la AKT fosforila e inactiva a TSC1/2, lo que activa a mTORC1 y se restringe la señalización a través de TLR y NF- κ B. De esta forma, la vía PI3K/AKT es crítica para restringir la respuesta inflamatoria y favorecer la activación de los macrófagos a M2 (Figura 6). Además, la activación de PI3K es esencial para la actividad de ARG1, y actúa en paralelo a STAT6⁸⁰⁻⁸².

Otro de los factores de transcripción que participan en la polarización de macrófagos M2 es PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ), el cual se produce constitutivamente en macrófagos, pero aumenta por el estímulo de IL-4 e IL-13. Su activación inhibe el funcionamiento de STAT1, NF- κ B y AP-1, por lo que suprimen la polarización a M1⁸³⁻⁸⁵. Asimismo, KLF2 y KLF4 (Krueppel-like factor) se unen al ADN para impedir la actividad de NF- κ B, por lo que también inhiben a los macrófagos M1^{86,87}.

Por otro lado, la unión de la IL-10 a su receptor (IL-10R) induce la activación de JAK1 y TYK2, que a su vez fosforilan y activan a STAT3, lo cual reduce la transcripción de citocinas como IL-1 β , IL-12, TNF α e IFN γ , con lo cual la IL-10 ejerce su función de mediador de la respuesta inflamatoria (Figura 6)⁸⁸. Así, las diversas vías de señalización activadas en los macrófagos M2 actúan en conjunto para modular la actividad de moléculas asociadas a los M1.

M2

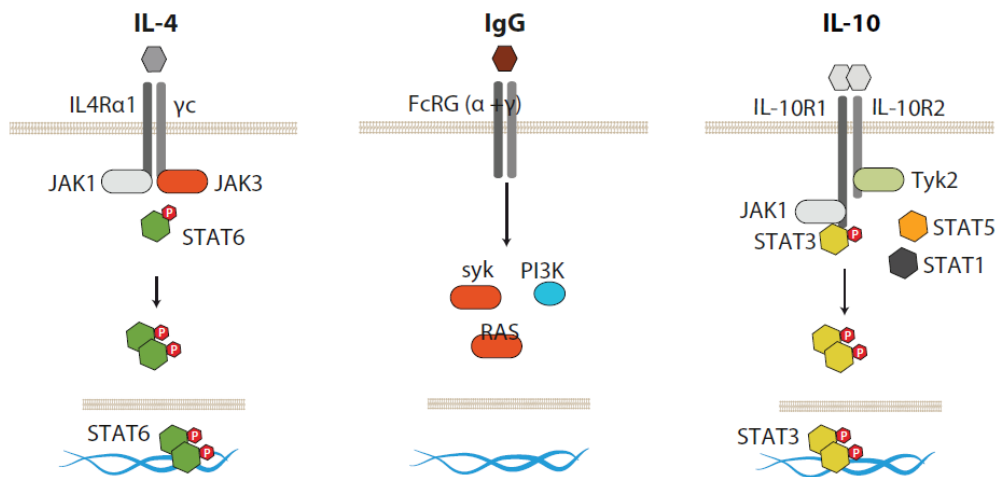


Figura 6. Principales vías de señalización en los macrófagos M2. Las IL-4, IgG e IL-10 son los ejemplos de los principales estímulos necesarios para la inducción de macrófagos M2. Como se explica en el texto, STAT3, STAT6 y PI3K son los principales mediadores de la activación M2. Modificado de Martínez FO y Gordon S, 2014⁵⁴.

En las décadas recientes, se han estudiado otros mecanismos que participan en la activación de macrófagos como las regulaciones epigenéticas, entre las que destacan los microRNA. Los microRNA son parte de una familia de RNA pequeños de alrededor de 21 nucleótidos (nt) que han surgido como reguladores postranscripcionales de las células. Varios estudios han indagado en la función que desempeñan durante la activación de los macrófagos, demostrando que la respuesta inflamatoria excesiva o deficiente está asociada a la desregulación del perfil de microRNA, así como la polarización a M2 también expresa microRNA específicos⁸⁹⁻⁹¹.

1.3 Los microRNA

Los microRNA son una clase de RNA pequeños no codificantes, de cadena simple, conformados por 18-22 nucleótidos (nt), evolutivamente conservados y descritos como reguladores postranscripcionales de los

RNA_m, ya que se unen a secuencias complementarias blanco en los RNA_m e interfieren con su traducción, alterando la producción de proteínas^{92,93}. Además de esta función, recientemente se ha descrito que también pueden ingresar al núcleo celular para regular la transcripción de genes, de otros microRNA, RNA largos no codificantes y ribosomas⁹⁴. Por lo que, los microRNA participan en todos los procesos biológicos de las células que incluyen la proliferación, diferenciación, apoptosis y traducción de señales; expandiendo el entendimiento de los mecanismos que regulan la producción de RNA_m, proteínas y otros RNA^{92,93}.

1.3.1 Biogénesis de los microRNA

La mayoría de los microRNA ($\pm 50\%$) son independientes de los transcritos que codifican proteínas, por lo que son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II) y, algunas veces, por la RNA Pol III. El resto de los microRNA se localizan en intrones de genes que codifican proteínas u otros RNA no codificantes, siendo producto del *splicing* o *splicing* alternativo, pero procesados de forma separada. También se ha descrito microRNA derivados de sitios de inicio de la transcripción o del inicio y terminación de la transcripción⁹⁵⁻⁹⁸. Si bien el origen de los microRNA puede variar, se caracterizan por compartir algunos elementos de las vías de procesamiento de microRNA maduros. A continuación, mencionaremos sus principales vías de generación.

1.3.1.1 La vía canónica

La producción de los microRNA comienza con la transcripción de microRNA primarios (pri-miRNA) por la RNA Pol II. Estos pri-miRNA (≥ 100 nt) están plegados en una estructura tallo-horquilla, con caperuza de guanosina en el extremo 5' y poliadenilación en el extremo 3'. La estructura de horquilla sirve como sustrato para el microprocesador formado por Drosha, una RNasa III, y DGCR8, proteína de unión a RNA. Drosha hace cortes endonucleolíticos, generando al precursor del microRNA (pre-miRNA) (Figura 7). El pre-miRNA (60-100 nt) es transportado fuera del núcleo por la exportina-5 y Ran-GTP. Una vez en citoplasma, el pre-miRNA es

procesado por Dicer, otra RNasa III, así como por otras enzimas y proteínas de unión a RNA de cadena doble, generando un microRNA de cadena doble (18-24 nt), las cuales reciben el nombre de 5p o 3p^{93,96,99}.

En años recientes, se ha demostrado que ambas cadenas (5p y 3p) son funcionales y su selección está asociada al contenido de GC y AU en el extremo 5', al tipo celular, el estímulo a la célula, entre otras. Además, contrario a lo que se creía, las cadenas pueden ser cargadas al RISC al mismo tiempo¹⁰⁰. Una vez seleccionada la cadena y cargada al RISC, el microRNA recluta a diversas proteínas de unión al RNA, incluyendo TRBP y a las proteínas catalíticas Argonauto (AGO), formando un complejo ribonucleoproteico conocido como miRISC (microRNA RNA-induced silencing complex). Las AGO son esenciales para el ensamblaje y función del miRISC, e interactúan directamente con los microRNA y con las proteínas glicina-triptófano (GW182), que actúan río abajo como efectoras en la represión de la traducción. Por último, el microRNA dirige al miRISC hacia el RNAm blanco a través de la complementariedad de secuencias, reprimiéndolo o degradándolo por deadenilación (Figura 7)^{93,99,101}.

El mecanismo por el que el RNAm será reprimido depende de la complementariedad entre ambos: un nivel bajo, resulta en la inhibición de la traducción; mientras que un nivel alto, en la degradación del RNAm por el complejo miRISC. En los microRNA de animales, es muy común la baja complementariedad^{99,102}. Se consideraba que la región semilla de los microRNA (nucleótidos 2-7) el elemento mínimo para reconocer al UTR 3' (*untranslated region*) de los RNAm blanco. Sin embargo, recientemente se ha descrito que cuando el miRISC se une a su RNA blanco, AGO sufre cambios conformacionales que permiten un emparejamiento extendido con la región semilla y expone, además, parte de la región 3' del microRNA (nucleótidos 13-16) para interacción adicional con el blanco¹⁰³.

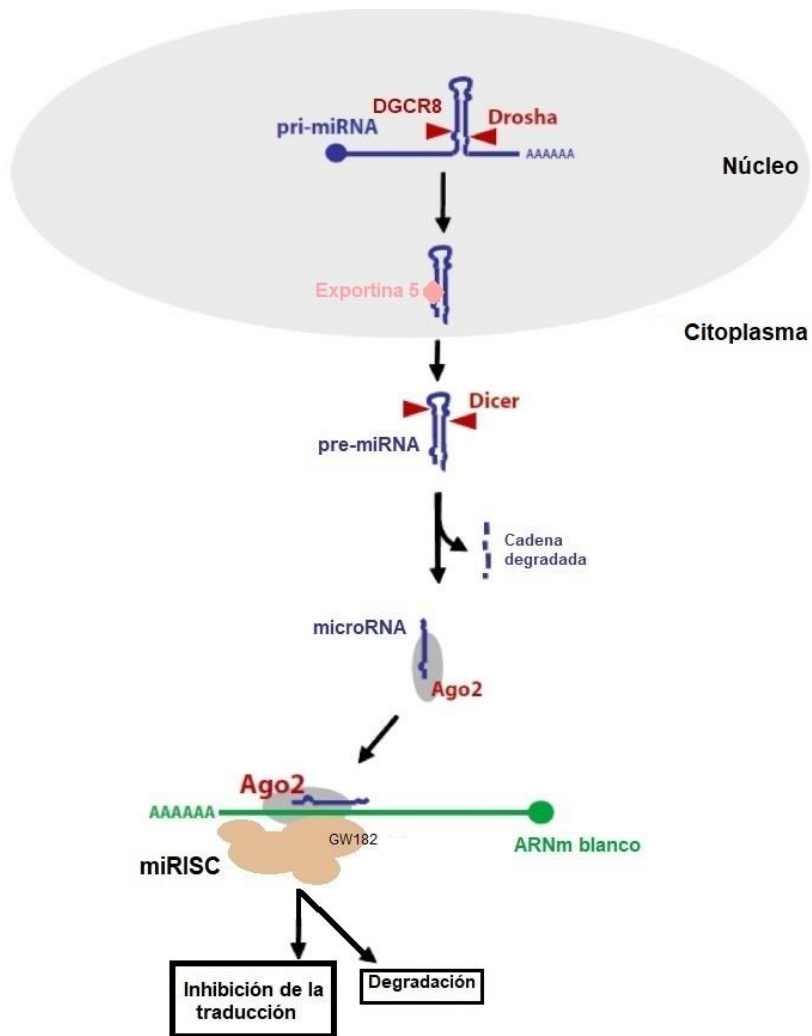


Figura 7. Vía canónica de biogénesis de los microRNA. Los microRNA se transcriben como pri-miRNAs por la RNA Pol II; las enzimas Drosha y DGCR8 lo cortan formando al pre-miRNA, el cual es exportado de núcleo a citoplasma por la exportina 5. El pre-miRNA es procesado por Dicer y otras proteínas a un microRNA maduro de cadena doble. La cadena guía se selecciona por su estabilidad y es cargada en el RISC, formando el miRISC que contiene a proteínas Argonautas, al que guía que hacia el UTR 3' del RNAm para reprimir su traducción. Para más detalles checar el texto. Adaptada de Hammond, SM¹⁰⁴.

1.3.1.2 Las vías independientes a Drosha

1.3.1.2.1 miRtrones

Estos microRNA se generan a partir del procesamiento de intrones por la maquinaria del *splicing*. El intrón es cortado por el empalmosoma y procesado por la enzima de desramificación Ldbr. Después, se pliega en una estructura secundaria tipo pre-microRNA. Las horquillas de los miRtrones son aproximadamente 10 pb más cortas que las horquillas de los pri-microRNA canónicos, por lo que evitan el procesamiento por Drosha y es exportado directamente por la exportina 5 y Ran-GTP, para entrar al resto del procesamiento por la vía canónica¹⁰⁵.

1.3.1.2.2 Vía de pre-microRNA con caperuza m⁷G

Otro grupo de microRNA se define porque su transcripción ocurre por el inicio y la terminación de esta, a través de la RNA Pol II, y en su extremo 5' contiene una caperuza m⁷G. Mientras están siendo transcritos, se unen CBC (complejo de unión a la caperuza), PHAX (adaptador fosforilado para la exportación del RNA) y la exportina 1, encargados de exportar snRNA (RNA pequeños nucleares) fuera del núcleo. Una vez en citoplasma, Dicer y las proteínas accesorias cortan y generan un microRNA con caperuza m⁷G en 5'. Otro grupo de microRNA que contiene también la caperuza m⁷G y es procesado igual, son los microRNA que se derivan de sitios de inicio de la transcripción y están ligados a las pausas en el promotor de la RNA Pol II^{98,106}.

La diversidad de vías para la biogénesis de los microRNA nos indica su importancia biológica en los procesos celulares, que incluyen la regulación postranscripcional de RNAm y su reimportación al núcleo para regular la transcripción de genes, de otros RNA y de ribosomas. Además, patógenos de vertebrados, como virus o helmintos parásitos los usan para evadir a las células inmunitarias¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Por ejemplo, el helminto *Echinococcus multilocularis* secreta un imitador del miR-71 a través de exosomas, que es fagocitado por los macrófagos, en los que reduce la producción de NO, clave en la respuesta de macrófagos M1¹¹⁰.

1.3.2 La función de los microRNA en el sistema inmune

El sistema inmune está dividido en innato y adaptativo. El primero provee la primera línea de defensa contra patógenos a través de células como los monocitos, macrófagos, DC y granulocitos; y el segundo responde de manera antígeno específica a las señales mandadas por las células innatas a través de los linfocitos T y B. Los microRNA han sido asociados con el desarrollo y funcionamiento de las células inmunitarias. Por ejemplo, se ha encontrado que algunos microRNA controlan su proliferación y la hipersensibilidad de los granulocitos a estímulos de los patógenos, impidiendo una respuesta inflamatoria exagerada¹¹¹⁻¹¹³. En linfocitos B, los microRNA son necesarios para su desarrollo, diferenciación, proliferación y para los rearrreglos de los genes V(D)J, genes que se recombinan para generar el amplio espectro de anticuerpos que existe¹¹⁴⁻¹¹⁶. Además, contribuyen a que estas células produzcan anticuerpos IgG1 de alta afinidad^{117,118}.

Por otra parte, durante el desarrollo de los linfocitos T se producen distintos patrones de microRNA dependiendo de su etapa de maduración¹¹⁹. Una vez maduros, los linfocitos T se activan cuando reconocen antígenos por medio de las células presentadoras de antígeno, como las DC y macrófagos, con lo cual, los linfocitos T proliferan e inician la respuesta inmune, procesos en los cuales los microRNA son esenciales^{120,121}. Además, los microRNA también son importantes en la diferenciación y funcionamiento de las DC y macrófagos¹²². Por ejemplo, el miR-155-5p es indispensable para la función óptima de las DC en la fagocitosis de los patógenos y la presentación de antígenos^{123,124}.

De esta forma, los diversos estudios de microRNA en células del sistema inmune han demostrado que estos tienen un estricto balance para controlar y eliminar a los patógenos, así como prevenir la inflamación excesiva que resulte en una patología inmune. La desregulación de este balance resulta en patologías autoinmunes, inflamatorias o cáncer^{125,126}.

1.3.3 Los microRNA y macrófagos

1.3.3.1 Los macrófagos M1

Como ya mencionamos, los macrófagos M1 se activan a través de los TLR que reconocen PAMP, con lo cual se transcriben RNAm asociados a citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras para reclutar a otras células y erradicar la infección de manera efectiva. Después del estímulo de TLR4, se activan las vías de señalización de NF- κ B y MAPK lo que induce la producción de diversos microRNA como miR-146a-5p, miR-155-5p, let-7e, miR-21a-5p y miR-125b-5p de manera dependiente a NF- κ B; y miR-21a-5p, miR-146b-3p, miR-146b-5p y miR-155-5p de forma dependiente a MAPK, los cuales inhiben a RNAm asociados a procesos antiinflamatorios y favorecen a los asociados a proinflamación¹¹³⁻¹²⁶.

Por otra parte, la inducción de los diversos perfiles de los macrófagos también ocurre por la inhibición de algunas moléculas durante la diferenciación. De esta forma, las moléculas asociadas a M1 suprimen a las asociadas a M2 y viceversa, evitando así la activación hacia la otra. Los microRNA también son parte de este mecanismo: el miR-720, se une directamente a GATA3, y el agrupamiento de los mi R-23a/27a/24-5p, suprime las vías de JAK1/STAT6, IRF4 y PPAR- γ al unirse directamente a sus RNAm, inhibiendo la polarización a M2^{141,142}. Otro ejemplo, es el miR-155, el cual aumenta sus niveles posestímulo a los TLR2, TLR3, TLR4 o TLR9 de forma dependiente a MyD88 y TRIF, y es esencial para la polarización de los macrófagos a M1. Una de sus funciones es estabilizar al RNAm *Tnf* y hacer blanco en los RNAm de SHIP1, SOCS1, C/EBP β y IL-13R α 1, siendo los primeros tres reguladores negativos de la vía de los TLR y promotores de la respuesta antiinflamatoria, y el último esencial para la activación de STAT6^{131,143-146}. De esta forma, los microRNA favorecen la producción de moléculas y citocinas inflamatorias, mientras inhiben la polarización a M2.

Por otro lado, diversos investigadores han estudiado el aumento y la disminución en la acumulación de los microRNA durante la activación de los macrófagos a M1. Entre estos estudios, está el hecho en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) de ratón estimulados con LPS e IFN γ ; por medio de un arreglo,

observaron el aumento en los niveles de 109 microRNA, de los cuales confirmaron, mediante RT-qPCR, el aumento de los miR-181a, miR-155-5p, miR-204-5p y miR-451¹⁴⁷. En otro estudio, macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica humana estimulados con IFN γ y TNF α modificaron los niveles de 303 microRNA y los autores confirmaron el aumento en la acumulación de los miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-193a-5p y miR-29b-3p como exclusivos de M1¹⁴⁸.

Finalmente, aunque se ha demostrado que los miR-146a y miR-155 son fundamentales para la diferenciación de macrófagos M1, también forman parte de la retroalimentación negativa necesaria para recuperar el estado homeostático de los macrófagos. El miR-146a-5p tiene como blanco a los RNAm *Irak1* y *Traf6*; y el miR-155 a los RNAm *Ikk β* , *Ikk ϵ* y *Myd88*; por lo que, disminuyen la producción de las citocinas IFN tipo I, IL-1 β , IL-6 y la actividad de la vía de MyD88^{132,135-144}.

1.3.3.2 Los macrófagos M2

Los macrófagos M2 se polarizan al reconocer a las citocinas IL-4 e IL-13, con lo que activan moléculas que contrarrestan la inflamación y ayudan a volver a un estado de homeostasis. Si bien, muchos de los microRNA asociados a los macrófagos M1 han sido estudiados, la caracterización y función de los microRNA en M2 ha sido menor. Entre los primeros microRNA descritos asociados al estímulo *in vitro* e *in vivo* con IL-4/IL-13, está el miR-511, al que se ha predicho por bioinformática que tiene como blancos RNAm asociados con inflamación¹⁵⁹. En macrófagos de sistema nervioso central, o microglía, la exposición a IL-4 e IL-13 aumenta los niveles del miR-124, cuyos blancos son los RNAm *Cd86*, *Nos2* y *Tnf*, y favorece la producción de YM1 y MR. Este aumento en la acumulación del miR-124 contribuyó a reducir los signos de la EAE, modelo murino de la esclerosis múltiple^{160,161}.

Otros estudios han demostrado que los microRNA asociados a los macrófagos M2 inhiben la acumulación de RNAm asociados a inflamación^{135,162-165}. Por ejemplo, el miR-223 hace blanco en el RNAm

Stat3, con lo que inhibe a IL-6 e IL-1 β ; el miR-34a se une al RNAm *Notch1*, necesario para la producción de TNF α e IL-6; y el miR-210 inhibe al RNAm de NF- κ B¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. En contraste, el miR-466l se une a su UTR 3' del RNAm *Il10*, protegiéndolo de la degradación por tristetraprolina en lugar de inhibirlo¹⁶⁹. Cabe mencionar que la IL-10 inhibe la producción del miR-155-5p, con lo que aumentan los niveles de SHIP1 y SOCS1, reguladores negativos de la vía de los TLR¹⁷⁰.

Algunos grupos han identificado microRNA en macrófagos M2 utilizando microarreglos y bioinformática. Por ejemplo, se reportó que los MDMO estimulados con IL-4 aumentaron la producción de los miR-500a-5p y miR-502-3p; sin embargo, no se menciona que otros microRNA aumentaron¹⁴⁷. En otro estudio, utilizando también MDMO estimulados con IL-4 durante 72 h, encontraron cambios en 54 microRNA, de los que solo pudieron comprobar aumento en los niveles del miR-342-3p, el cual es dependiente de la vía de IL-4/STAT6. Además, demostraron que en macrófagos provenientes de la infección con el helminto *Brugia malayi* aumentan los niveles de este microRNA¹⁷¹.

La identificación de los microRNA inducido en macrófagos M2 durante las infecciones con helmintos ha sido muy poca. Entre estos estudios destaca el hecho en macrófagos M2 recuperados de cavidad peritoneal de ratones infectados con *B. malayi* durante 3 semanas, en el que aumentaron los niveles de 19 microRNA, de los que se comprobó la producción de los miR-125b-5p, miR-146a-5p, miR-199b-5p y miR-378-3p. Continuaron analizando por bioinformática e *in vitro* la función del miR-378-3p y encontraron que es parte de la retroalimentación negativa de la vía IL-4R/PI3K/AKT y su producción es dependiente de la IL-4¹⁷². En otro estudio hecho por Guo *et al.* hicieron un cocultivo de macrófagos RAW 264.7 y metacestodos de *E. multilocularis* durante 6 o 12 h, e identificaron aumento en distintos microRNA como miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-21a-5p, miR-146b-5p, miR-99b-3p, miR-125a-5p y miR-378. Por medio de análisis bioinformático, encontraron que estos microRNA tienen como blanco a los RNAm *Tnf*, *Il1a*, *Il6*, *Il12a*, *Il12b*, *Ccl22* y *Ccl18*, con lo cual sugieren que los microRNA podría ser uno de los mecanismos de regulación de la inflamación en los macrófagos expuestos a los ES de los helmintos¹⁷³.

2. JUSTIFICACIÓN

Previamente, se ha confirmado que los TcES contrarrestan la inflamación en modelos de enfermedades autoinmunes y que gran parte de ese efecto es por la inhibición de características M1 en los macrófagos^{39,40,42}. En años recientes, los microRNA han surgido como moléculas fundamentales para la regulación de la expresión genética en diversos tipos celulares. Específicamente en macrófagos, son esenciales para su diferenciación y funciones inmunes^{90,91,174}. Por ejemplo, sabemos que el miR-155-5p favorece la activación de vías asociadas a inflamación, mientras que el miR-378-3p es necesario para la señalización de IL-4 en macrófagos^{172,175,176}. Por lo tanto, es necesario determinar cómo los TcES regulan directa o indirectamente los niveles de microRNA que contribuyen a inhibir las características de macrófagos M1 utilizando un modelo *in vitro*. Esto aportará información importante que incrementará nuestro conocimiento sobre las vías de señalización y mecanismos utilizados por los macrófagos en respuesta a los TcES.

3. HIPÓTESIS

Los TcES inhiben la diferenciación a M1 e inducen características de M2 en macrófagos expuestos a ambientes inflamatorios *in vivo* e *in vitro*. En la última década, se ha demostrado que la diferenciación de los macrófagos está regulada por cambios en el perfil de expresión de microRNA. Lo anterior nos sugiere que los TcES modificarían el perfil de expresión de los microRNA en macrófagos M1, para contrarrestar la respuesta inflamatoria.

Los cambios en la expresión de microRNA en macrófagos M1 podrían ser determinados a través de un arreglo de microRNA. Se esperaría que los TcES aumentaran la expresión de microRNA que tienen como blanco genes asociados a inflamación y disminuyeran la expresión de microRNA que se han asociado con el establecimiento de macrófagos tipo inflamatorios.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el perfil de microRNA inducido por los TcES en macrófagos inflamatorios de ratón.

4.2 Objetivos particulares

1. Verificar los niveles de las citocinas IL-6, IL-10, IL-12 y TNF α en los macrófagos M1 expuestos a los TcES *in vitro* utilizando ELISA.
2. Comprobar la producción de NO en los macrófagos M1 expuestos a los TcES *in vitro* utilizando el reactivo de Griess.
3. Determinar los niveles de las enzimas NOS2 y ARG1 en macrófagos M1 expuestos a los TcES *in vitro* mediante citometría de flujo.
4. Explorar cambios en la acumulación de RNAm en macrófagos M1 expuestos a los TcES *in vitro* utilizando un arreglo de 248 RNAm asociados a la respuesta inflamatoria.
5. Identificar cambios en el perfil de microRNA de macrófagos M1 expuestos a los TcES *in vitro* por medio de un arreglo de 566 microRNA.
6. Analizar las vías de señalización asociadas al perfil de microRNA *in silico* por medio del programa bioinformático DIANA tools.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. LINEAMIENTOS ÉTICOS

Las ratonas cepa BALB/c utilizadas en los experimentos de este proyecto se manejaron de acuerdo con las «Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 2001)» y «Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)» durante las estancias de investigación en The Ohio State University (OSU) y The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, haciendo el máximo esfuerzo para minimizar su sufrimiento. Los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂.

5.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratonas adultas de 6-8 semanas de edad de la cepa BALB/c se adquirieron de los laboratorios Harlan (EE. UU.) y se mantuvieron en los bioterios de la OSU o de The Research Institute at Nationwide Children's Hospital. Las ratonas se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos durante todo el experimento.

5.3. CULTIVO DE *Taenia crassiceps* Y OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN (TcES)

Se utilizaron metacestodos de *T. crassiceps* cepa ORF. Los metacéstodos se obtuvieron de ratonas previamente infectadas (6 semanas de infección) por medio de lavados peritoneales con solución salina estéril (SSFE). Se seleccionaron los metacestodos que median aproximadamente 2.0 mm de diámetro y no tenían gemaciones para inocularse en cavidad peritoneal de ratonas BALB/c de 6-8 semanas de edad sin infecciones previas. Todo lo anterior se hizo en condiciones de esterilidad.

Para obtener los TcES, los metacestodos se recuperaron de la cavidad peritoneal de ratonas BALB/c con 8 semanas de infección, se lavaron con SSFE y se mantuvieron en frascos de cultivo celular de 150 cm² (Corning, EE. UU.) a 37° C y 5 % de CO₂ durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 1000 g por 10 min; se recuperó, se colocó en un tubo Amicon Ultra de 50 kDa (Millipore, EE. UU.) y se centrifugó a 2000 g por 30 min. Inmediatamente, la fracción de proteínas superior a

50 kDa se recuperó, se le añadieron inhibidores de proteasa y se hicieron alícuotas que se almacenaron a -80° C hasta su uso. La concentración de las proteínas fue determinada por el ensayo de Bradford (Biorad, EE. UU.). Todo lo anterior fue realizado bajo estrictas condiciones de esterilidad.

5.4. OBTENCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA (MDMO)

Para obtener las células derivadas de médula ósea, el fémur y la tibia se extrajeron de ratonas BALB/c; se cortaron ambos extremos de los huesos y se perfundieron con SSFE¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Las células derivadas de médula ósea se contaron y ajustaron a 5×10^6 células/ml para sembrarse en cajas de cultivo de 6 pozos con medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 5 % de penicilina/estreptomicina y 20 ng/ml de M-CSF recombinante (BioLegend, EE. UU.); el M-CSF se agregó cada tercer día a los cultivos.

Al día 7, las células derivadas de médula ósea se despegaron mecánicamente de los pozos para comprobar su diferenciación a macrófagos. Después de despegarlos, se lavaron con SSFE, se contaron y ajustaron a 1×10^6 células/ml para realizar una citometría de flujo. Los macrófagos se seleccionaron por los niveles de F4/80 y CD11b en membrana, siendo el 98 % de la población (Figura 8). La contaminación con neutrófilos se descartó ya que solo el 1.8 % de la población celular era Ly6G⁺, confirmando que las condiciones de cultivo favorecen la diferenciación a macrófagos.

Una vez comprobado lo anterior, el resto de los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) se lavaron, se les añadió nuevo DMEM suplementado sin M-CSF y se hicieron los estímulos por grupos.

5.5. ESTÍMULO DE MDMO

Los MDMO se estimularon con LPS (1 µg/ml), TcES (25 µg/ml), IL-4 (20 ng/ml) o con la combinación de TcES+LPS o TcES+IL-4; inmediatamente, se pusieron en cultivo a 37° C, 5 % CO₂ durante 4 o 24 h. Transcurrido este tiempo, los sobrenadantes se recuperaron, las células se despegaron para citometría de flujo o se rompieron por medio de QIAzol (QIAGEN, EE. UU.) para obtener los RNA totales (Figura 9).

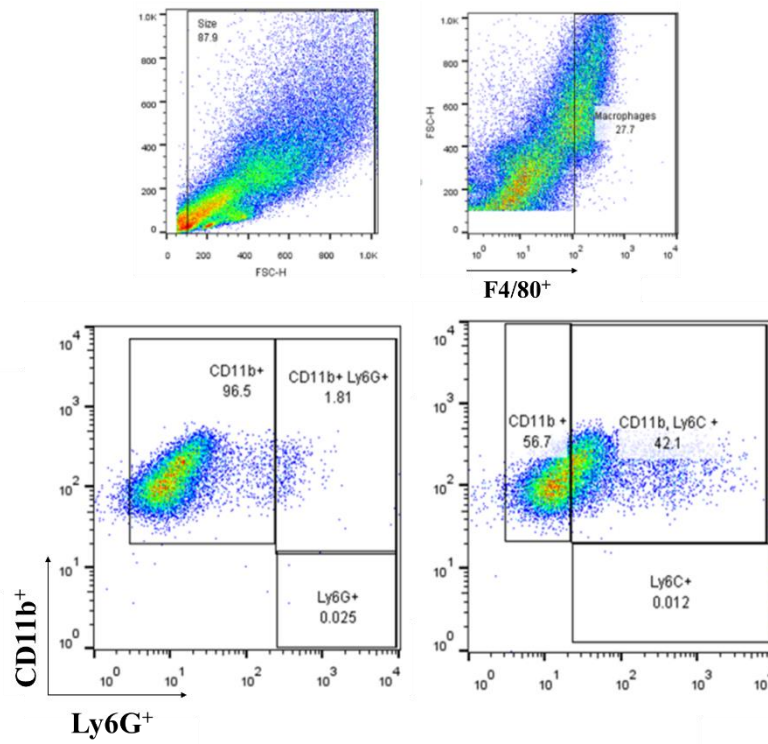


Figura 8. Las células derivadas de médula ósea tienen moléculas de membrana características de macrófagos. Las células provenientes de los cultivos con rM-CSF fueron F4/80⁺CD11b⁺Ly6C⁺, mientras que solo el 1.8 % fue Ly6G⁺. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

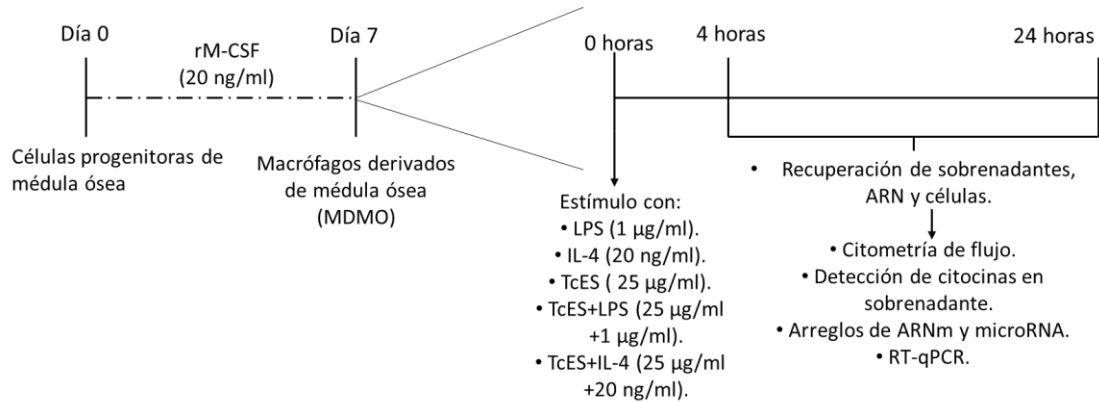


Figura 9. Diagrama de flujo del diseño experimental general. Para diferenciar a los macrófagos, células progenitoras de médula ósea se cultivaron con M-CSF recombinante a 37°C y 5% de CO₂ por 7 días. Al día 7, los MDMO se lavaron y estimularon con los siguientes estímulos: LPS (1 µg/ml), TcES (25 ng/ml) o ambos durante 4 o 24 horas. Los sobrenadantes, RNA total o células se recuperaron para su posterior análisis.

5.6. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los MDMO se despegaron de los pozos de cultivo de manera mecánica, se contaron, ajustaron a 1×10^6 células, tiñeron con el colorante fluorescente azul L23105 (Life Technologies, EE. UU.), para descartar células muertas, e incubaron con los anticuerpos antirratón CD16/32 (BioLegend, EE. UU.) en buffer de FACS, para evitar el reconocimiento inespecífico de los otros anticuerpos, durante 15 min a 4° C. Después, se añadieron 300 μ l de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm 10 min, se decantó el sobrenadante, se agregaron 100 μ l de buffer de FACS, se tiñeron con los marcadores de superficie CD11b (Alexa Fluor 700), F4/80 (Brilliant violet 785), CD86 (Brilliant violet 421), PD-L1 (PE-Cy7) y PD-L2 (PE), y se incubaron por 30 min a 4° C; las células teñidas se lavaron 3 veces con buffer de FACS. Todos los anticuerpos mencionados previamente fueron comprados a BioLegend, EE. UU.

Para teñir marcadores intracelulares, las células se permeabilizaron con el reactivo Fix/Perm de acuerdo con el protocolo del kit *Cytofix/Cytoperm* (BD BioScience, EE. UU.). Los anticuerpos intracelulares utilizados fueron antiNos2 (PE, eBiosciences, EE. UU.) y antiH/mArginasa-1 (APC, R&D systems, EE. UU.). Después de agregarlos, se incubaron las células por 30 min a 4° C.

Para detectar a las diferentes moléculas de membrana marcadas se utilizaron los citómetros de flujo FACSCalibur (BD BioScience, EE. UU.) y LSR II (BD BioScience, EE. UU.). La estrategia de análisis que se utilizó en los MDMO fue:

1. Selección por tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A), para eliminar restos celulares y eritrocitos.
2. Selección en FSC-A y FSC-H, para eliminar los agregados celulares.
3. Selección de negativos para el marcador fluorescente azul L23105 (L/D).
4. Selección de positivos para las moléculas de membrana CD11b y F4/80.

Por lo que los marcadores de MDMO fueron L/D-CD11b*F4/80*. El análisis de datos se hizo utilizando el software FlowJo (FlowJo, LLC).

5.7. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CITOCINAS

Para detectar las citocinas secretadas por los MDMO en respuesta a los diferentes estímulos, los sobrenadantes de los cultivos celulares se analizaron por ELISA Sándwich (Peprotech, EE. UU.) para detectar IL-6, IL-10, IL-12 y TNF α siguiendo el protocolo del fabricante¹⁸⁰.

5.8. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El NO producido por los macrófagos fue detectado utilizando el reactivo de Griess¹⁸¹. Primero, colectamos 50 μ l del sobrenadante de cada grupo y lo añadimos a una placa de 96 pozos, en cuyos pozos habíamos añadido previamente 50 μ l del reactivo de Griess. El reactivo de Griess se hizo con 0.1 % N-(1-Naftil) etilenediamino dihidroclorido (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en agua destilada y 1 % sulfanilamido (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en 5 % de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, EE. UU.). La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min y los nitritos se leyeron en un lector de placas (BioTek, EE. UU.) a 540 nm. El valor de los nitritos se calculó usando una curva estándar de nitrito de sodio con un rango de concentración 0 a 100 μ M.

5.9. EXTRACCIÓN Y CALIDAD DE LOS RNA

El RNA total se extrajo de los MDMO con los diferentes estímulos (M_{LPS} , M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ o PBS (M_0)) usando el reactivo QIAzol (QIAGEN, EE. UU.). Después, el RNA fue purificado siguiendo el protocolo de *kit* miRNeasy (QIAGEN, EE. UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante¹³². La concentración e integridad de los RNA totales se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington,

DE) y el bioanalizador Agilent 2100, respectivamente. Todas las muestras tuvieron un rango de longitud de onda 260/280 de 2.0 o mayor.

5.10. ARREGLOS DE RNAm Y microRNA

Para el análisis del transcriptoma, 50 ng/ μ l de RNA se utilizaron para el panel de inflamación de nCounter (NanoString mRNAs) y para el de los microRNA de nCounter (NanoString microRNA). Ambos arreglos se hicieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el Genomic Shared Resource, OSU. El análisis de datos del panel inflamatorio y de los microRNA del nCounter se hizo utilizando el software de análisis nSolver™ de acuerdo con el fabricante^{182,183}. Para el panel inflamatorio del nCounter, normalizamos usando el factor de normalización y sustrajimos el fondo (media de los controles negativos ± 2 desviaciones estándar). Después, normalizamos usando la media geométrica de los RNA *housekeeping* como se ha reportado previamente¹⁸³. Posteriormente, usamos las cuentas normalizadas y calculamos las veces de cambios o fold change (FC) al comparar M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$, o M_{LPS} contra M_0 .

Para normalizar los datos del arreglo de los microRNA, primero normalizamos usando el factor de normalización. El fondo se sustrajo de los datos usando la media de los controles negativos ± 2 desviaciones estándar. Finalmente, usamos el top 75 de microRNA¹⁸². Las cuentas normalizadas se usaron para calcular las FC al comparar M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$, o M_{LPS} contra M_0 . Del total de 566 sondas incluidas en el arreglo, se detectaron cambios en 183 y 236 microRNA a las 4 y 24 h, respectivamente. Los *heat maps* se generaron con MultiExperiment Viewer (MeV) (<http://mev.tm4.org/#/welcome>), los cuales están representados como datos transformados a Log_2 .

Los datos de los arreglos están depositados en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) con los números de acceso

GSE125170 para los RNAm y GSE125171 para los microRNA como parte de la superserie GSE125172, que son públicos a partir de la fecha de publicación del artículo derivado de esta tesis.

5.11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para hacer el análisis de enriquecimiento de los RNAm blanco en las vías de señalización KEGG y los términos GO utilizamos DIANA-mirPath v2.0¹⁸⁴, en la cual introducimos el perfil de los microRNA que obtuvimos entre los diferentes tratamientos (M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$, o M_{LPS} contra M_0).

5.12. RT-QPCR EN TIEMPO REAL

Los ensayos TaqMan (Applied Biosystems, EE. UU.) se usaron para cuantificar y validar los niveles de los RNAm y microRNA. El ADNc fue generado de los RNAm utilizando una reacción de reverso transcripción (RT) de 15 μ l elaborada con 2.0 μ l de buffer (10x), 0.8 μ l de 100mM dNTPs, 1.0 μ l de reverso transcriptasa, 2.0 μ l de *primer* del RNAm y 1 μ g de RNA total. La reacción de RT se incubó a 16° C por 30 min, 42° C por 30 min y 85° C por 5 min. Se mantuvo a -70° C hasta su uso.

Para los microRNA, se preparó una reacción de RT de 15 μ l con 2.0 μ l de buffer (10x), 0.2 μ l de 100mM dNTP, 1.0 μ l de reverso transcriptasa, 0.2 μ l de inhibidor de RNAsas (20 U/ μ l), 3.0 μ l de primer del microRNA y 100 ng de RNA total. La reacción de RT se incubó como mencionamos anteriormente.

Para los RNAm y microRNA, se hicieron reacciones cuadruplicadas de PCR en tiempo real en el 7500 Real Time PCR system. La reacción de amplificación estaba compuesta por 10 μ l de la mezcla universal para PCR TaqMan (2x) y 1 μ l de la sonda específica de RNAm o microRNA. Las reacciones se preincubaron 10 min a 95° C y se amplificaron en 40 ciclos que consistían en 10 s a 95° C, 40 s a 60° C y 5 s a 72° C (detección de la fluorescencia). Como RNA de referencia o *housekeeping* utilizamos al RNA 18S y a los RNAm *Actb* y *Gapdh*. La

cuantificación relativa fue calculada utilizando $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Todos los ensayos de RNAm y microRNA se probaron para linealidad y reproducibilidad (eficiencia de la PCR entre 1.9 y 2.0 para todos los ensayos). Todos los *primers* se compraron en Applied Biosystems. Las secuencias de los *primers* se muestran en el Apéndice 10.2.

5.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico utilizado fue la prueba *t* de Student. Los datos graficados se muestran como la media \pm SEM. Los valores obtenidos de $p < 0.05$ son considerados como significativos. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 6.

6. RESULTADOS

6.1 LOS TcES REDUCEN LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS ASOCIADAS A INFLAMACIÓN EN MACRÓFAGOS EXPUESTOS A LPS

Primero, para saber si en nuestro modelo los TcES reducen la respuesta inflamatoria de los macrófagos, determinamos los niveles de las citocinas asociadas a inflamación: IL-6, IL-12 y TNF α ; y de la asociada a regulación IL-10 en cultivos de MDMO expuestos durante 4 h o 24 h a los TcES (en adelante M_{TcES}), lipopolisacáridos de *E. coli* (M_{LPS}), TcES + LPS (M_{TcES+LPS}) o PBS (M₀) (Figura 9). Los sobrenadantes de los cultivos de M_{TcES} tenían niveles altos de IL-10 y bajos de las IL-6 y TNF α comparado con los otros grupos a las 4 h postestímulo (Figura 10A, B y D). Sin embargo, a las 24 h postestímulo todas las citocinas tuvieron una baja o nula producción en los M_{TcES}. Por otro lado, en los sobrenadantes de M_{TcES+LPS} a las 24 h postestímulo hubo una menor producción de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF α comparado con los M_{LPS}, y aumentó la producción de la IL-10 (Figura 10B-D). Lo anterior, demuestra que los TcES reducen la producción de citocinas asociadas a inflamación en macrófagos inflamatorios.

Para continuar, quisimos saber si estas alteraciones en la producción de citocinas se debían a cambios en la transcripción de sus RNAm, por lo que medimos la acumulación de los RNAm *Il10*, *Il6*, *Il12b* y *Tnf* por RT-qPCR a las 4 h y 24 h postestímulo. A las 4 h postestímulo, la acumulación del RNAm *Il10* fue significativamente mayor en los M_{LPS} comparados con todos los grupos (Figura 11A), mientras que la acumulación de los RNAm *Il6*, *Il12b* y *Tnf* fue igual entre los M_{TcES+LPS} y M_{LPS} (Figura 11B-D), lo cual no coincide con la producción de citocinas. A las 24 h postestímulo, todos los grupos tuvieron una alta acumulación del RNAm *Il10* (Figura 12A), mientras que los M_{TcES+LPS} aumentó significativamente la acumulación del RNAm *Il6* y, además, no hubo diferencias en la acumulación de *Il12b* y *Tnf* (Figura 12B-C). Así, nuestros resultados sugieren que un mecanismo postranscripcional sería el responsable de las diferencias que encontramos entre la producción de citocinas y la acumulación de sus RNAm.

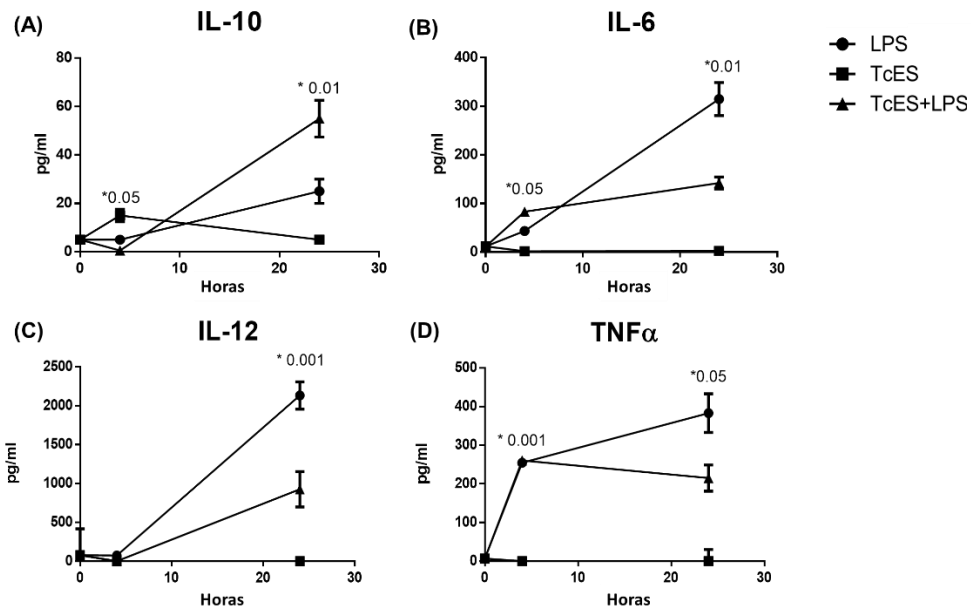


Figura 10. Los TcES disminuyen la producción de citocinas asociadas a inflamación en macrófagos estimulados con LPS. Cinética de niveles de IL-10 (A), IL-6 (B), IL-12 (C) y TNF α (D) en sobrenadantes de los MDMO con los diferentes estímulos. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes usando 3 réplicas por estímulo. La significancia se calculó usando la prueba de t. *p < 0.01, ** p < 0.05 y *** p < 0.001.

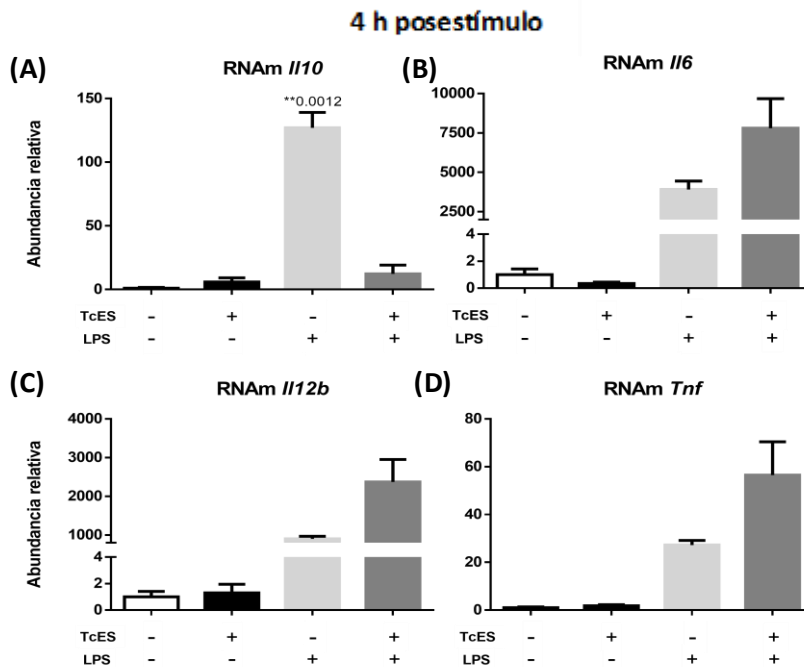


Figura 11: La acumulación de RNAm de las citocinas no coincide con su producción a las 4 h postestímulo. Evaluación de la acumulación de los RNAm *Il10* (A), *Il6* (B), *Il12b* (C) y *Tnf* (D) por RT-qPCR en M₀, M_{TcES}, M_{LPS} y M_{TcES+LPS} 4 h postestímulos (n=6, 3 réplicas por condición). La acumulación de los RNAm es representada como la media relativa de expresión (\pm SD).

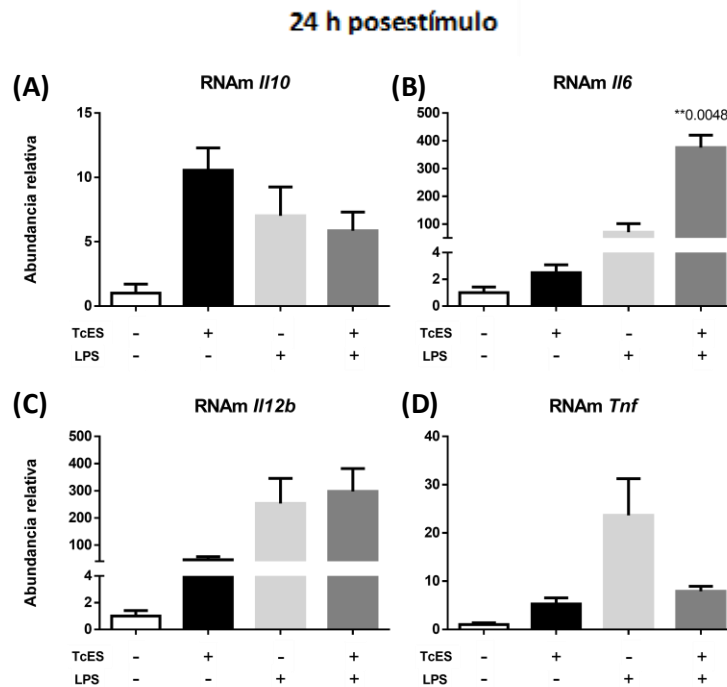


Figura 12: La acumulación de RNAm de las citocinas no coincide con su producción a las 24 h posestímulo. Evaluación de la acumulación de los RNAm *Il10* (A), *Il6* (B), *Il12b* (C) y *Tnf* (D) por RT-qPCR en los grupos previamente mencionados a las 24 h posestímulos (n=6, 3 réplicas por condición). La acumulación de los RNAm es representada como la media relativa de expresión (\pm SD).

Después, quisimos saber si los TcES además de afectar la producción de citocinas asociadas a inflamación, también podían modificar la producción del óxido nítrico (NO), que es esencial en los macrófagos M1 para eliminar patógenos. Por lo que evaluamos la producción de nitritos a las 4 h y 24 h posestímulo a través del método de Griess¹⁸¹. A las 4 h posestímulo, no encontramos nitritos en los sobrenadantes, indicando claramente que aún no hay producción de NO en ningún grupo (Figura 13). No obstante, a las 24 h posestímulo la producción de nitritos aumentó en los M_{LPS} , tal como esperábamos. Sin embargo, para nuestra sorpresa, los niveles de nitritos disminuyeron significativamente en los $M_{TcES+LPS}$, teniendo una producción casi igual a la de los M_0 y M_{TcES} (Figura 13). Estos resultados nos indican que los TcES no solo disminuyen la respuesta de citocinas asociadas a inflamación, sino que también inhiben la producción de NO en macrófagos inflamatorios.

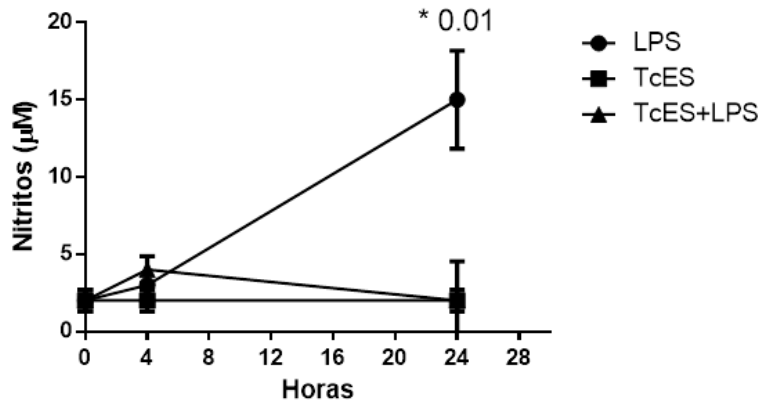


Figura 13. Los TcES inhiben la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS. Cinética de la producción de nitritos en lo sobrenadantes de los M_{TcES} , M_{LPS} y $M_{TcES+LPS}$. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes usando 3 réplicas por estímulo. La significancia se calculó usando la prueba de t. * $p < 0.01$.

Ya que los TcES inhiben la producción de NO, nos preguntamos si esto se debía a cambios en la producción de la enzima NOS2, la cual lo sintetiza a partir de la L-arginina, o si era por el aumento en la producción de la enzima ARG1, la cual compete con NOS2 por la L-arginina (Figura 4). Primero, utilizando RT-qPCR medimos la acumulación de los RNAm *Nos2* y *Arg1* en M_{TcES} , M_{LPS} , $M_{TcES+LPS}$, M_{IL-4} y $M_{IL-4+TcES}$ a las 24 h postestímulo, y encontramos que los TcES no inducen aumentos en la acumulación del RNAm *Arg1* (Figura 14). Sin embargo, la acumulación del RNAm *Nos2* fue estadísticamente menor en el $M_{TcES+LPS}$ respecto al M_{LPS} (Figura 14), sugiriendo que los TcES inhiben la producción de NO por la disminución en la transcripción del RNAm *Nos2*. No obstante, quisimos saber si la producción de las enzimas NOS2 y ARG1 también cambiaba, por lo que las medimos mediante citometría de flujo. A las 24 h postestímulo, como esperábamos, los M_{LPS} y M_{IL-4} producen elevados porcentajes de macrófagos NOS2⁺ y ARG1⁺, respectivamente; mientras que los M_{TcES} no tienen producción (Figura 15A-B). Además, el porcentaje de células ARG1⁺ es igual estadísticamente entre $M_{TcES+IL-4}$ y M_{IL-4} (Figura 15D). Para nuestra sorpresa, el porcentaje de macrófagos NOS2⁺ también fue estadísticamente igual entre $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} (Figura 15C). Estos datos muestran que la enzima NOS2 está produciéndose a pesar de la disminución en la acumulación de su RNAm y que su producción no está relacionada con la disminución en la producción de NO que encontramos (Figura 13).

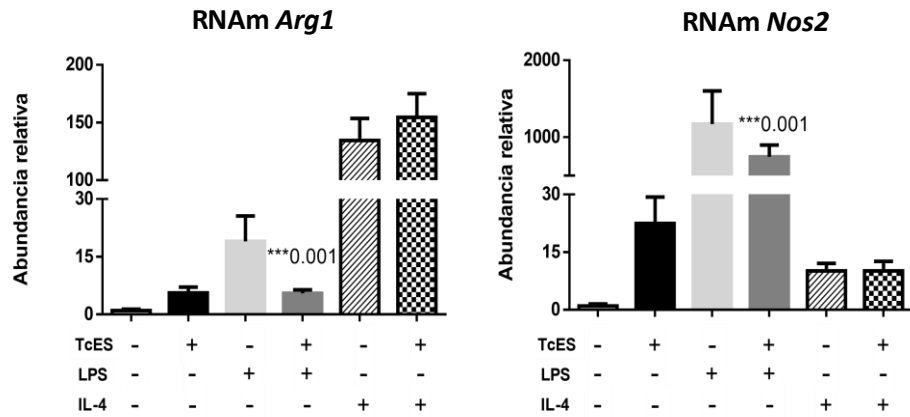


Figura 14. Los TcES no alteran los niveles de los RNAm *Arg1*, pero sí del RNAm *Nos2* a las 24 h postestímulo. Evaluación de los RNAm *Nos2* y *Arg1* en MDMO estimulados como se indica mediante RT-qPCR (n=6, 3 réplicas de las condiciones). Los niveles de los RNAm se representan como la media relativa de expresión (±SD).

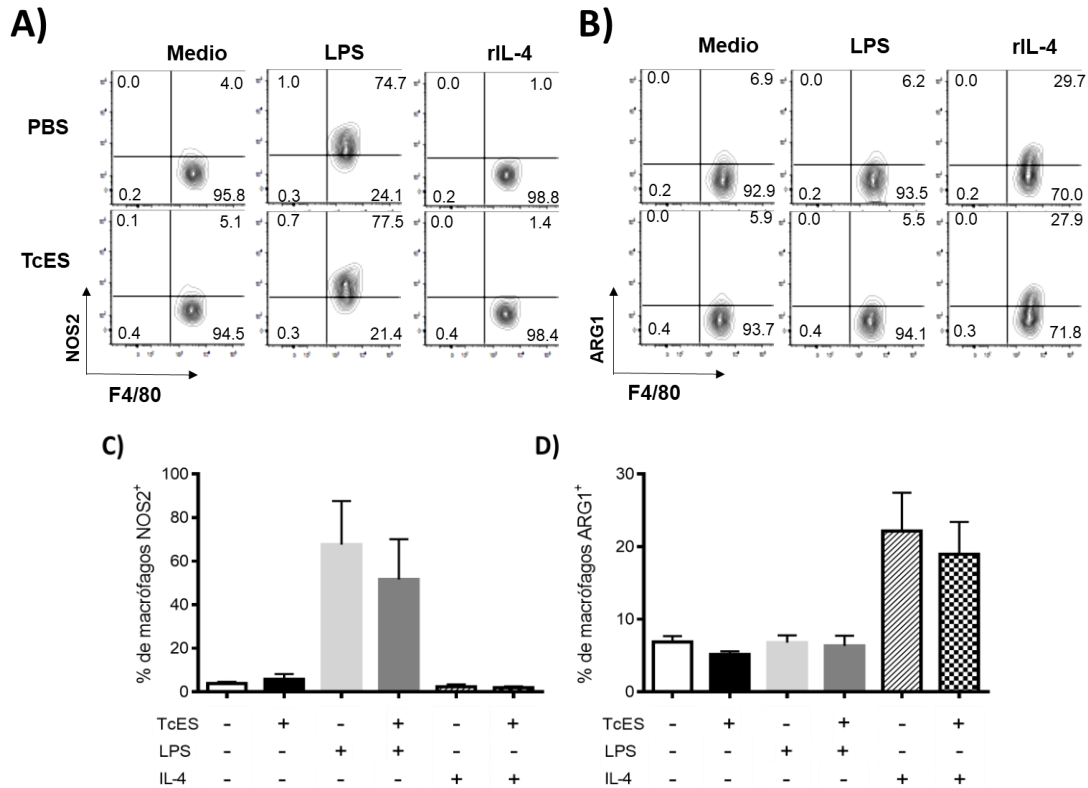


Figura 15. Los TcES no modifican los niveles de las enzimas NOS2 y ARG1 en macrófagos. *Dot plots* representativos de la citometría de flujo de MDMO F4/80⁺NOS2⁺ (A) y F4/80⁺ARG1⁺ (B) a las 24 h postestímulo con alguno de los siguientes estímulos: LPS (1 µg/ml), TcES (25 ng/ml), IL-4 (20 ng/ml), TcES+LPS, TcES+IL-4 o PBS. Las gráficas de barras representan el porcentaje de macrófagos F4/80⁺NOS2⁺ (C) y F4/80⁺ARG1⁺ (D) a las 24 h postestímulo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

6.2. LA ACUMULACIÓN DE RNAM ASOCIADOS A INFLAMACIÓN ES SIMILAR ENTRE $M_{TcES+LPS}$ Y M_{LPS}

Debido a que nuestros datos sugieren que los TcES atenúan la respuesta inflamatoria inducida por LPS en los MDMO a través de la disminución de citocinas asociadas a inflamación, pero no de sus RNAm, quisimos saber si la acumulación de otros RNAm se ve afectada, por lo que hicimos un arreglo de 248 RNAm asociados a inflamación en M_0 , M_{LPS} , M_{TcES} y $M_{TcES+LPS}$ a las 4 y 24 h posestímulo (Figura 16). El top 10 de los RNAm más acumulados en los M_{LPS} , M_{TcES} y $M_{TcES+LPS}$ a las 4 y 24 h se muestran en la Tabla 1 y 2, respectivamente; mientras que los RNAm comunes se muestran en la Tabla 3. Para revisar la lista completa de los RNAm producidos en los MDMO checar los apéndices 10.3, 10.4 y 10.5. Los RNAm producidos diferencialmente entre $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} se muestran en el Apéndice 10.6.

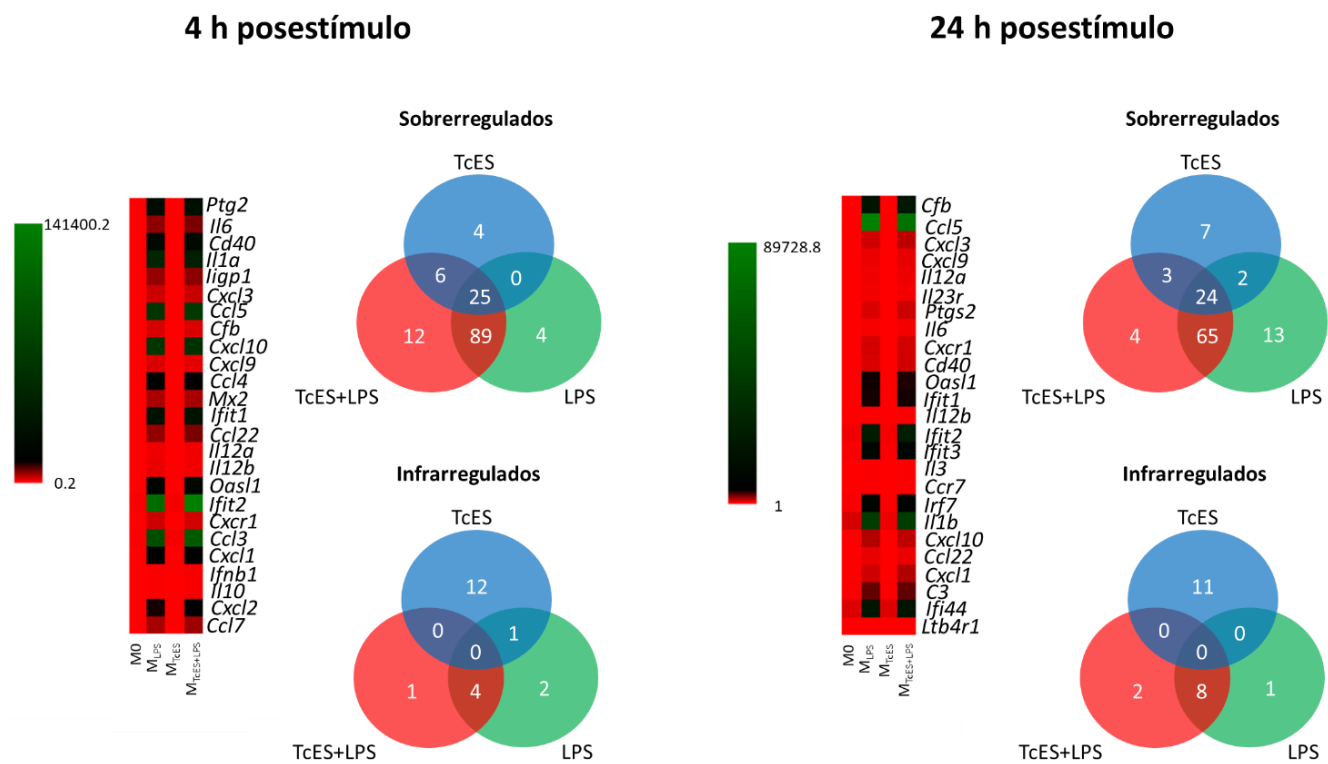


Figura 16. Top 25 de RNAm aumentados en MDMO. Los *heat maps* muestran la producción de RNAm entre los M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} a las 4 h y 24 h posestímulo. Cada fila representa los niveles de un RNAm en particular y cada columna representa una muestra específica. El color a escala ilustra los niveles de producción relativa de los RNAm: el verde incrementos; el rojo disminución; y el negro valores promedio. Los diagramas de Venn muestran los RNAm únicos y sobrepuestos entre las muestras.

Como esperábamos, aumentó la acumulación de RNAm asociados a inflamación en los M_{LPS} respecto a los M₀ a las 4 y 24 h posestímulo (Tabla 1 y 2). Los RNAm que aumentaron incluyen a *I1a*, *I16*, *I12a*, *I12b*, *Tnf* y *Nos2*, moléculas que previamente han sido reportadas como marcadores en macrófagos estimulados con LPS⁵⁶. En contraste, pero también esperado, los M_{TCEs} tienen poca acumulación de RNAm distintivos de macrófagos M1; pero aumenta la acumulación de RNAm de enzimas que pertenecen a la vía de las MAPK con respecto a M₀ a las 4 y 24 h posestímulo (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Top 10 de RNAm modificados entre los M_{TCEs}, M_{TCEs+LPS} o M_{LPS} a las 4 h posestímulo.

Top 10 de RNAm											
4 h posestímulo											
M _{TCEs} vs. M ₀				M _{TCEs+LPS} vs. M ₀				M _{LPS} vs. M ₀			
Aumento		Disminución		Aumento		Disminución		Aumento		Disminución	
RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2
Citocinas		Citocinas		Citocinas		Receptores		Citocinas		Citocinas	
<i>Ifna1</i>	1.5	<i>I12b</i>	-2.1	<i>I16</i>	12.5	<i>Ccr2</i>	-2.4	<i>I16</i>	12.3	<i>Ifna1</i>	-2.4
Quimiocinas		<i>I23a</i>	-2.1	<i>I1a</i>	11.8	<i>Cd163</i>	-3.0	<i>I1a</i>	12.0	Factores de transcripción	
<i>Ccl21a</i>	2.6	<i>I1b</i>	-2.8	<i>I12a</i>	9.3	<i>Ptger3</i>	-3.3	<i>I12a</i>	9.5	<i>Mef2c</i>	-2.4
Factores de transcripción		Proteínas complementarias		<i>I12b</i>	9.2	<i>Ccr3</i>	-4.1	<i>I12b</i>	9.9	Receptores	
<i>Irf3</i>	3.1	<i>C2</i>	-2.1	Quimiocinas		Factores de transcripción		Quimiocinas		<i>Ptger3</i>	-3.3
<i>Mafg</i>	1.6	Receptores		<i>Cxcl3</i>	11.3	<i>Mef2c</i>	-2.1	<i>Cxcl3</i>	11.2	<i>Ccr2</i>	-2.6
Proteínas complementarias		<i>Cxcr1</i>	-2.2	<i>Cxcl10</i>	11.0	Enzimas		<i>Cxcl10</i>	11.1	<i>Cd163</i>	-3.0
<i>C1s</i>	2.6	Factores de transcripción		<i>Cxcl9</i>	10.3	<i>Limk1</i>	-1.2	<i>Cxcl9</i>	10.7	Enzimas	
Proteínas antivirales		<i>Elk1</i>	-2.1	<i>Ccl22</i>	9.4			<i>Ccl22</i>	9.1	<i>Plcb1</i>	-1.1
<i>Hspb1</i>	2.2	Proteínas asociadas a inflamación		Proteínas asociadas a inflamación				Proteínas asociadas a inflamación		<i>Ptgs1</i>	-1.3
Enzimas		<i>Lta</i>	-2.1	<i>Ptgs2</i>	12.6			<i>Ptgs2</i>	12.4	<i>Limk1</i>	-1.7
<i>Defa-rs1</i>	3.0	Enzimas		<i>Oasl1</i>	9.2			<i>Oasl1</i>	9.0		
<i>Prkca</i>	3.0	<i>Flt1</i>	-2.1								
<i>Ptgs1</i>	1.0	<i>Plcb1</i>	-2.9								
Otras		Otras									
<i>Mbl2</i>	2.2	<i>Kng1</i>	-1.2								

Log2- logaritmo base 2

Tabla 2. Top 10 de RNAm modificados entre los M_{TcES}, M_{TcES+LPS} o M_{LPS} a las 24 h posestímulo.

Top 10 de RNAm											
24 h posestímulo											
M _{TcES} vs. M ₀				M _{TcES+LPS} vs. M ₀				M _{LPS} vs. M ₀			
Aumento		Disminución		Aumento		Disminución		Aumento		Disminución	
RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2	RNAm	Log2
Citocinas		Citocinas		Citocinas		Citocinas		Citocinas		Citocinas	
<i>Ifna1</i>	1.9	<i>Il1b</i>	-1.2	<i>Il12a</i>	8.4	<i>Tgfb3</i>	-2.2	<i>Il12a</i>	8.0	<i>Tgfb3</i>	-2.2
Quimiocinas		Quimiocinas		<i>Il6</i>	7.6	Receptores		<i>Il6</i>	7.4	Receptores	
<i>Ccl21a</i>	2.7	<i>Cxcl10</i>	-4.9	Quimiocinas		<i>Ccr3</i>	-3.5	Quimiocinas		<i>Mrc1</i>	-4.9
Proteínas antivirales		<i>Ccl24</i>	-1.9	<i>Ccl5</i>	11.4	<i>Cd163</i>	-2.4	<i>Ccl5</i>	11.6	<i>Cd163</i>	-3.0
<i>Hspb1</i>	2.3	<i>Cxcl2</i>	-1.2	<i>Cxcl3</i>	10.2	<i>Mrc1</i>	-4.3	<i>Cxcl3</i>	9.7	<i>Trem2</i>	-2.4
Enzimas		Receptores		<i>Cxcl9</i>	8.7	<i>Trem2</i>	-2.2	<i>Cxcl9</i>	8.4	<i>Ccr3</i>	-1.3
<i>Alox5</i>	3.2	<i>Tlr2</i>	-2.0	Enzimas		Enzimas		Proteínas asociadas a inflamación		Enzimas	
<i>Plcb1</i>	2.4	<i>Cd86</i>	-1.8	<i>Ptgs2</i>	7.7	<i>Ptgs1</i>	-5.5	<i>Cfb</i>	14.1	<i>Ptgs1</i>	-3.5
<i>Prkca</i>	3.6	Factores de transcripción		Receptores		Factores de transcripción		Receptores		Factores de transcripción	
<i>Map2k6</i>	2.4	<i>Cebpb</i>	-1.5	<i>Il23r</i>	7.7	<i>Myc</i>	-2.3	<i>Cxcr1</i>	7.5	<i>Maff</i>	-2.2
<i>Ppp1r12b</i>	2.0	<i>Relb</i>	-1.1	<i>Cxcr1</i>	7.5	<i>Mef2c</i>	-1.5	<i>Il23r</i>	7.8	<i>Myc</i>	-3.3
<i>Defa-s1</i>	1.7	Enzimas		<i>Cd40</i>	7.3			<i>Cd40</i>	7.0	<i>Mef2c</i>	-1.4
<i>Map3k9</i>	1.7	<i>Nos2</i>	-1.6	Proteínas asociadas a complemento				Enzimas			
		Proteínas antivirales		<i>Cfb</i>	14.3			<i>Ptgs2</i>	7.2		
		<i>Ifit1</i>	-1.8	Proteínas asociadas a inflamación							
				<i>Areg</i>	1.4						

Log2- logaritmo base 2

Tabla 3. RNAm comunes entre los M_{TcES}, M_{TcES+LPS} o M_{LPS} a las 4 y 24 h postestímulo.

RNAm comunes															
4 h								24 h							
RNAm	Cuentas normalizadas				Log2 (comparado con M ₀)			RNAm	Cuentas normalizadas				Log2 (comparado con M ₀)		
	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	M _{TcES}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}		M ₀	M _{TcES}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	M _{TcES}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}
Citocinas								Citocinas							
<i>Tnf</i>	35.3	88.0	7741.2	6999.2	1.3	7.8	7.6	<i>Il1a</i>	11.7	40.8	8981.6	7999.6	1.8	9.6	9.4
Receptores								Receptores							
<i>Cxcr2</i>	1.00	6.3	17.9	3.4	2.6	4.2	1.8	<i>Il7</i>	1.0	2.3	22.4	16.4	1.2	4.5	4.0
<i>Il1r1</i>	1.00	4.5	35.7	20.4	2.2	5.2	4.4	<i>Il10</i>	1.0	2.3	23.5	8.0	1.2	4.6	3.0
<i>Il23r</i>	1.00	5.4	39.0	13.8	2.4	5.3	3.8	Receptores							
<i>Ager</i>	1.00	3.7	55.3	63.4	1.9	5.8	6.0	<i>Il1r1</i>	1.0	2.3	21.4	21.5	1.2	4.4	4.4
<i>Cd40</i>	5.34	20.9	21579.2	20087.7	2.0	12.0	11.9	<i>Cd55</i>	1.0	4.0	24.5	17.3	2.0	4.6	4.1
<i>Ltb4r1</i>	0.80	12.3	94.3	70.0	3.9	6.9	6.4	<i>Nod1</i>	5.3	19.5	51.8	61.0	1.9	3.3	3.5
<i>Nod2</i>	1.71	6.3	328.5	310.1	1.9	7.6	7.5	<i>Nod2</i>	1.7	5.6	80.0	75.3	1.7	5.6	5.5
<i>Ptgir</i>	9.88	38.1	27.6	26.9	2.0	1.5	1.4	Quimiocinas							
Quimiocinas								Quimiocinas							
<i>Ccl3</i>	244.86	515.6	103665.1	91974.1	1.1	8.7	8.6	<i>Ccl2</i>	276.6	682.7	5385.0	6051.5	1.3	4.3	4.5
<i>Ccl4</i>	10.78	42.4	13755.0	14248.1	2.0	10.3	10.4	<i>Ccl4</i>	10.8	63.0	265.4	243.5	2.6	4.6	4.5
<i>Ccl5</i>	29.84	60.5	69902.2	65071.5	1.0	11.2	11.1	<i>Ccl7</i>	18.9	72.0	317.8	314.2	1.9	4.1	4.1
Factores de transcripción								Factores de transcripción							
<i>Maff</i>	4.43	14.9	141.5	145.6	1.7	5.0	5.0	<i>Ccl8</i>	1.0	2.3	119.8	106.4	1.2	6.9	6.7
Proteínas antivirales								Proteínas antivirales							
<i>Ift1</i>	38.91	102.6	30851.1	29157.0	1.4	9.6	9.6	<i>Ccl17</i>	1.0	4.8	5.7	4.7	2.3	2.5	2.2
<i>Ift3</i>	110.58	236.0	22381.1	19762.8	1.1	7.7	7.5	<i>Cxcl5</i>	1.0	2.3	28.7	18.1	1.2	4.8	4.2
<i>Mx1</i>	132.36	307.4	16684.6	16954.5	1.2	7.0	7.0	Factores de transcripción							
<i>Mx2</i>	3.53	20.0	3897.4	3864.7				<i>Irf3</i>	1.0	5.6	3.6	15.6	2.5	1.8	4.0
Enzimas								Proteínas del complemento							
<i>Iigp1</i>	1.71	14.9	5151.6	4775.6	3.1	11.6	11.5	<i>C1ra</i>	2.6	20.3	68.5	74.5	3.0	4.7	4.8
<i>Mapkapk5</i>	1.00	2.8	52.0	38.6	1.5	5.7	5.3	<i>C1s</i>	1.0	8.0	41.3	19.8	3.0	5.4	4.3
<i>Mmp9</i>	1.71	6.3	19.5	6.0	1.9	3.5	1.8	<i>C2</i>	1.0	16.2	25.6	14.7	4.0	4.7	3.9
<i>Nox1</i>	1.00	3.7	32.5	42.5	1.9	5.0	5.4	Proteínas antivirales							
Proteínas antiapoptóticas								Proteínas antivirales							
<i>Hsh2d</i>	1.00	8.8	16.2	30.8	3.1	4.0	5.0	<i>Mx2</i>	3.5	8.9	607.9	631.3	1.3	7.4	7.5
Proteínas del complemento								Enzimas							
<i>C1ra</i>	2.62	10.6	30.9	26.9	2.0	3.6	3.4	<i>Iigp1</i>	1.7	4.0	600.6	681.8	1.2	8.5	8.6
<i>Cfb</i>	0.80	3.7	1760.0	1813.3	2.2	11.1	11.1	<i>Mmp3</i>	1.0	12.1	2.5	3.0	3.6	1.4	1.6
Otras								Proteínas del complemento							
<i>Myl2</i>	1.71	6.3	8.1	7.3	1.9	2.2	2.1	<i>Mmp9</i>	1.7	10.5	44.4	30.7	2.6	4.7	4.2
								Otras							
								<i>Hras1</i>							
								1.0 4.0 9.9 5.5 2.0 3.3 2.5							

Log2- logaritmo base 2

De los 248 RNAm asociados a inflamación que medimos por el arreglo, aumentó la acumulación de 132 y 96 RNAm en los M_{TcES+LPS} a las 4 h y 24 h postestímulo, respectivamente; de los cuales solo compartió 6 y 3 RNAm con los M_{TcES} a las 4 y 24 h postestímulo, respectivamente. En contraste, los M_{TcES+LPS} compartieron

el aumento de 89 y 65 RNAm con los M_{LPS} a las 4 y 24 h postestímulo, respectivamente. Entre los RNAm compartidos por $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} se incluyen citocinas, quimiocinas, receptores y factores de transcripción como *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il12a*, *Il12b*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccl2*, *Ccl7*, *Cd86*, *Tlr2*, *Stat1*, *Stat3* y *Nfkb1* (Tabla 1 y 2). Con lo anterior, encontramos que el perfil de RNAm asociados a inflamación es similar en los $M_{TcES+LPS}$ comparado con los M_{LPS} . Sin embargo, esto contradice los resultados de producción de citocinas (Figura 10), por lo que, de nuevo, nos sugiere que un mecanismo postranscripcional participaría en contrarrestar la respuesta inflamatoria en los macrófagos expuestos a los TcES.

Para continuar, validamos la acumulación de 3 RNAm que son característicos de los macrófagos M1: *Il1b*, *Stat1* y *Cd86*; y de los dos RNAm característicos de los M2 que estaban incluidos en el arreglo: *Stat6* y *Chi3l3* por RT-qPCR. Los niveles de estos RNAm fueron similares a los observados en el arreglo de RNAm (Figura 17) indicando que, si bien los TcES no inhibe la acumulación de los RNAm asociados a inflamación, a algunos sí los disminuye respecto a M_{LPS} , pero no respecto a M_0 . Con estos resultados, se sigue apoyando la idea de que un mecanismo postranscripcional inducido por el TcES podría tener un papel en reducir la respuesta de los macrófagos a LPS. Estos datos sugieren que el mecanismo postranscripcional disparado por el TcES tendría un papel en modular la producción de citocinas inflamatorias específicas.

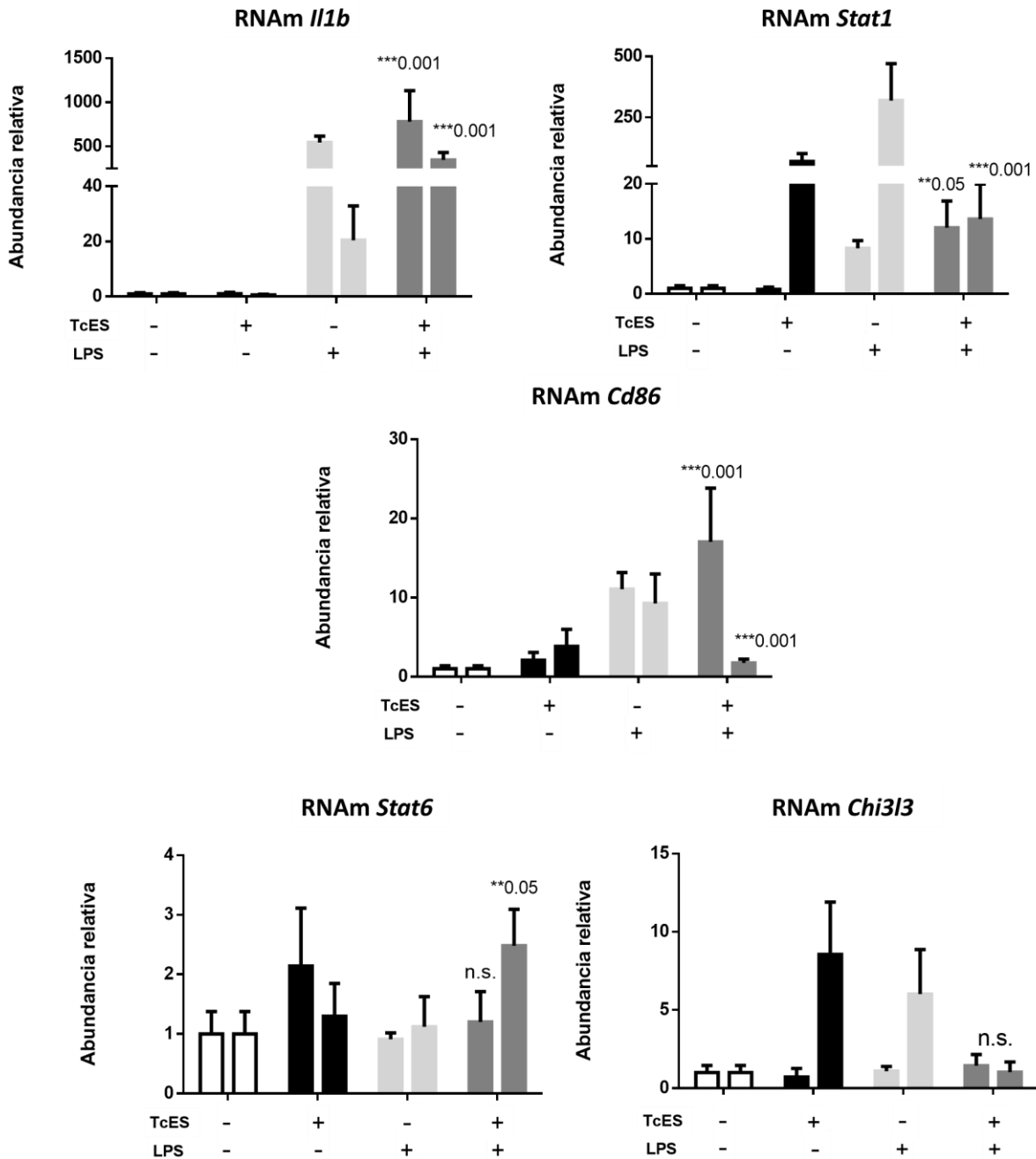


Figura 17. Validación e identificación de RNAm en los MDMO estimulados. Los macrófagos se cultivaron con TcES (25 µg/ml), LPS (1 µg/ml) o ambos TcES+LPS durante 4 (barra izquierda) o 24 horas postestímulo (barra derecha). Los niveles relativos de los RNAm seleccionados se determinaron por medio del ensayo de TaqMan de RNAm después de la normalización con el RNA 18S. Los niveles de los RNAm están en veces de cambios (*Fold change*-FC) relativos al grupo tratado con PBS (FC ± SD). Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes (n=6, 3 réplicas por condición).

6.3 LOS TcES MODIFICAN EL PERFIL DE LOS MICRORNA EN LOS MDMO ESTIMULADOS CON LPS

Los microRNA son moléculas esenciales para la regular postranscripcionalmente a microRNA, genes y otros RNA¹⁸⁵. La unión complementaria de los microRNA a su blanco reduce la traducción de estos¹⁰². Recientemente, se ha demostrado que los helmintos parásitos o sus ES inducen microRNA en macrófagos que regula la respuesta inmune de estos^{172,173,186}. Para determinar si los TcES atenúan la respuesta inflamatoria de los MDMO a través de microRNA, realizamos un arreglo de 566 microRNA en los M₀, M_{LPS}, M_{TcES}, y M_{TcES+LPS} a las 4 y 24 h posestímulo. Como resultado, identificamos el aumento en la acumulación de 7 y 89 microRNA en M_{LPS}; de 13 y 3 en M_{TcES}; y de 19 y 28 en M_{TcES+LPS} a las 4 y 24 h, respectivamente (Figura 18). El top 10 de microRNA con mayor y menor acumulación en M_{LPS}, M_{TcES} y M_{TcES+LPS} se muestran en la Tabla 4. La lista completa de los microRNA se muestra en los Apéndices 10.7, 10.8 y 10.9.

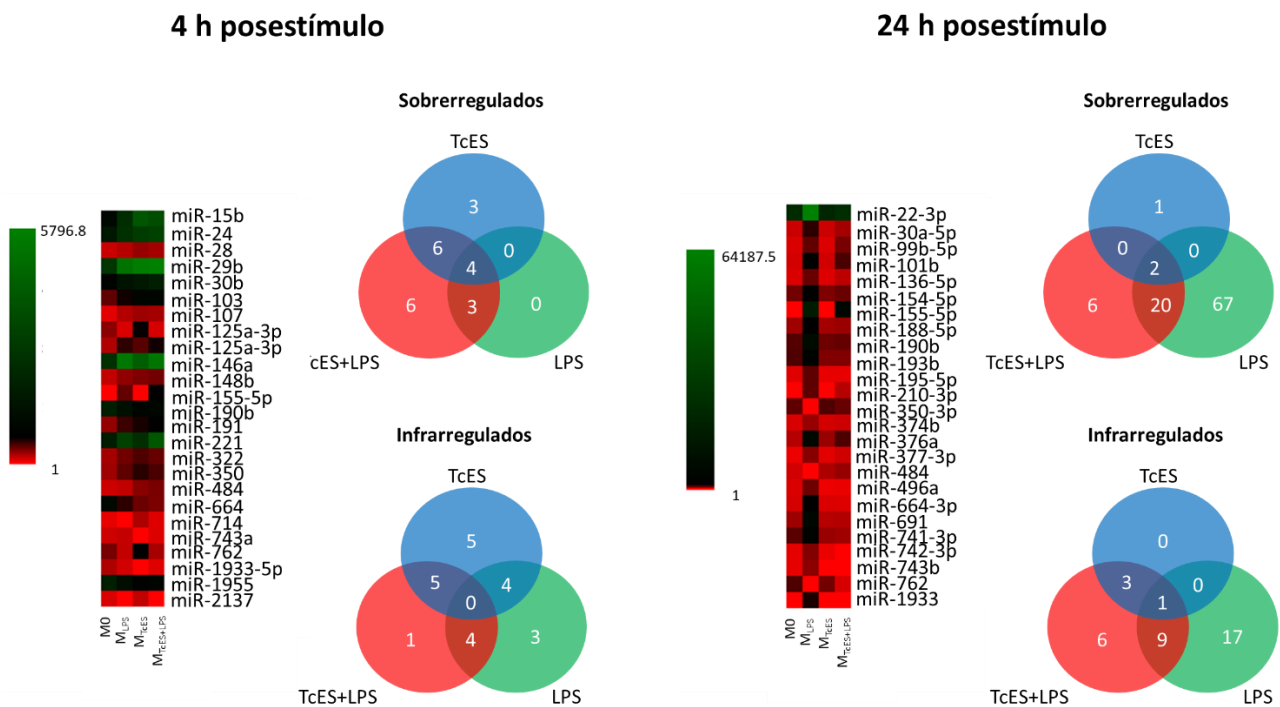


Figura 18. Top 25 de microRNA aumentados en MDMO. Los *heat map* muestran el top 25 de microRNA entre los M_{TcES}, M_{LPS} and M_{TcES+LPS} a las 4 y 24 h posestímulos. Cada fila representa un microRNA y cada columna representa una muestra específica. La escala de color indica el nivel relativo de producción de los microRNA: verde incremento; rojo decremento; y negro, valor promedio. El diagrama de Venn muestra a los microRNA únicos y sobrepuestos. Un total de 22 y 96 microRNA tuvieron cambios respecto al control a las 4 y 24 h posestímulos, respectivamente.

Tabla 4. Top 10 de microRNA modificados entre los MDMO estimulados por M_{TCEs}, M_{TCEs+LPS} o M_{LPS} a las 4 y 24 h posestímulo.

Top 10 de microRNA											
4 h posestímulo											
M _{TCEs} vs. M ₀				M _{TCEs+LPS} vs. M ₀				M _{LPS} vs. M ₀			
Aumentados		Disminuidos		Aumentados		Disminuidos		Aumentados		Disminuidos	
microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC
miR-421-3p	102.6	miR-539-5p	0.02	miR-155-5p	676.2	miR-190b-5p	0.5	miR-155-5p	402.6	miR-125a-3p	0.3
miR-484	2.4	miR-467c-5p	0.02	miR-546	112.8	miR-1955-5p	0.5	miR-546	76.7	miR-1224-5p	0.3
miR-350-3p	2.2	miR-1193-3p	0.02	miR-128-3p	88.9	miR-1933-5p	0.4	miR-146a-5p	2.1	miR-467f	0.02
miR-148b-3p	2.1	miR-199a-3p	0.01	miR-421-3p	84.3	miR-125a-3p	0.4			miR-539-5p	0.02
miR-125a-3p	2.1	miR-383-5p	0.01	miR-331-3p	74.1	miR-664-3p	0.4			miR-380-3p	0.02
miR-191-5p	2.1	miR-489-3p	0.01	miR-484	2.6	miR-1224-5p	0.4			miR-467c-5p	0.02
miR-30b-5p	2.1	miR-1953	0.01	miR-191-5p	2.5	miR-1193-3p	0.02			miR-714	0.02
miR-103-3p	2.1	miR-743a-3p	0.01	miR-30b-5p	2.4	miR-2137	0.01			miR-489-3p	0.01
miR-29b-3p	2.0	miR-410-3p	0.01	miR-99b-5p	2.4	miR-210-3p	0.01			miR-2137	0.01
		miR-1933-5p	0.00	miR-148b-3p	2.3	miR-804	0.01			miR-804	0.01
24 h posestímulo											
M _{TCEs} vs. M ₀				M _{TCEs+LPS} vs. M ₀				M _{LPS} vs. M ₀			
Aumentados		Disminuidos		Aumentados		Disminuidos		Aumentados		Disminuidos	
microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC	microRNA	FC
miR-362-5p	77.5	miR-743b-5p	0.01	miR-155-5p	4272.7	miR-326-3p	0.5	miR-155-5p	14139.0	mmu-miR-2137	0.01
miR-421-3p	93.7	miR-1949	0.01	miR-210-3p	285.39	miR-361-5p	0.3	miR-1933-5p	901.4	mmu-miR-362-3p	0.01
miR-1929-5p	74.9	miR-2134	0.01	miR-674-5p	171.63	miR-27a-3p	0.3	miR-210-3p	639.8	mmu-miR-484	0.01
		miR-2137	0.01	miR-331-3p	127.7	miR-221-3p	0.3	miR-574-3p	579.1	mmu-miR-152-3p	0.01
				miR-7a-5p	109.76	miR-23a-3p	0.3	miR-673-3p	518.4	mmu-miR-714	0.01
				miR-574-3p	96.8	miR-27b-3p	0.3	miR-674-5p	331.6	mmu-miR-107-3p	0.004
				miR-467a-5p	92.8	miR-762	0.2	miR-466a-5p	308.2	mmu-miR-324-5p	0.004
				miR-1929-5p	88.8	miR-1224-5p	0.2	miR-489-3p	284.9	mmu-miR-148b-3p	0.003
				miR-489-3p	87.8	miR-199a-3p	0.01	miR-1900	261.5	mmu-miR-350-3p	0.002
				miR-139-5p	83.8	miR-145-5p	0.01	miR-1953	242.9	mmu-miR-762	0.001

FC- Veces de cambios

Tabla 5. miRNA comunes entre los MDMO estimulados por M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ o M_{LPS} a las 4 y 24 h postestímulo.

microRNA compartidos entre tratamientos																
4 h								24 h								
microRNA	Cuentas normalizadas				FC (Comparado con M_0)			microRNA	Cuentas normalizadas				FC (Comparado con M_0)			
	M_0	M_{TcES}	$M_{TcES+LPS}$	M_{LPS}	M_{TcES}	$M_{TcES+LPS}$	M_{LPS}		M_0	M_{TcES}	$M_{TcES+LPS}$	M_{LPS}	M_{TcES}	$M_{TcES+LPS}$	M_{LPS}	
miR-15b-5p	984.8	4051.4	3731.6	2465.7	4.1	3.8	2.5	miR-362-5p	1.0	77.5	80.8	200.8	77.5	80.8	200.8	
miR-107-3p	73.8	251.6	234.8	197.9	3.4	3.2	2.7	miR-1929-5p	1.0	74.9	88.8	205.5	74.9	88.8	205.5	
miR-125a-5p	201.0	434.8	608.6	536.7	2.2	3.0	2.7									
miR-208b-3p	67.5	173.4	273.5	143.4	2.6	4.1	2.1									

FC- Veces de cambios

Los $M_{TcES+LPS}$ y M_{TcES} compartieron el aumento de 6 microRNA; mientras que los $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} solo compartieron el aumento de 3 a las 4 h posestímulo (Figura 18). Sin embargo, los $M_{TcES+LPS}$ no comparte microRNA con los M_{TcES} y sí 22 con los M_{LPS} a las 24 h posestímulo. Finalmente, los $M_{TcES+LPS}$ produjeron diferencialmente 3 y 20 microRNA comparado con el M_{LPS} a las 4 y 24 h posestímulo, respectivamente (Figura 18). Estos datos sugieren que los TcES inducen niveles tempranos (4h) de microRNA, seguido por el estímulo con LPS (24 h) en los $M_{TcES+LPS}$. Este fenómeno está asociado con el aumento en la acumulación de microRNA en M_{TcES} comparado con M_{LPS} (13 vs 7 microRNA) a las 4 h posestímulo.

Después, utilizamos a los microRNA con mayor acumulación en los macrófagos para evaluar su relevancia biológica por medio de la herramienta bioinformática DIANA tools. Comparamos M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ o M_{LPS} contra M_0 a las 4 h y 24 h posestímulo, y analizamos los términos GO y las vías KEGG. Los términos GO asociados a los M_{TcES} y $M_{TcES+LPS}$ fueron procesos biológicos asociados con el desarrollo de estructura anatómica, diferenciación celular y proceso de diferenciación de proteína celular a las 4 h posestímulo (Figura 19A-B). Mientras que a las 24 h posestímulo, asociados a los M_{TcES} estuvieron el desarrollo de la estructura anatómica, diferenciación celular y organización del cromosoma; y a los $M_{TcES+LPS}$ organelos, estructura anatómica y diferenciación celular (Figura 20A-B). Por último, la organización del cromosoma, procesos biosintéticos y complejos de proteína, y organelos, estructura anatómica y diferenciación celular son los términos GO para M_{LPS} a las 4 y 24 h posestímulo, respectivamente (Figura 19C y 20C).

4 h posestímulos

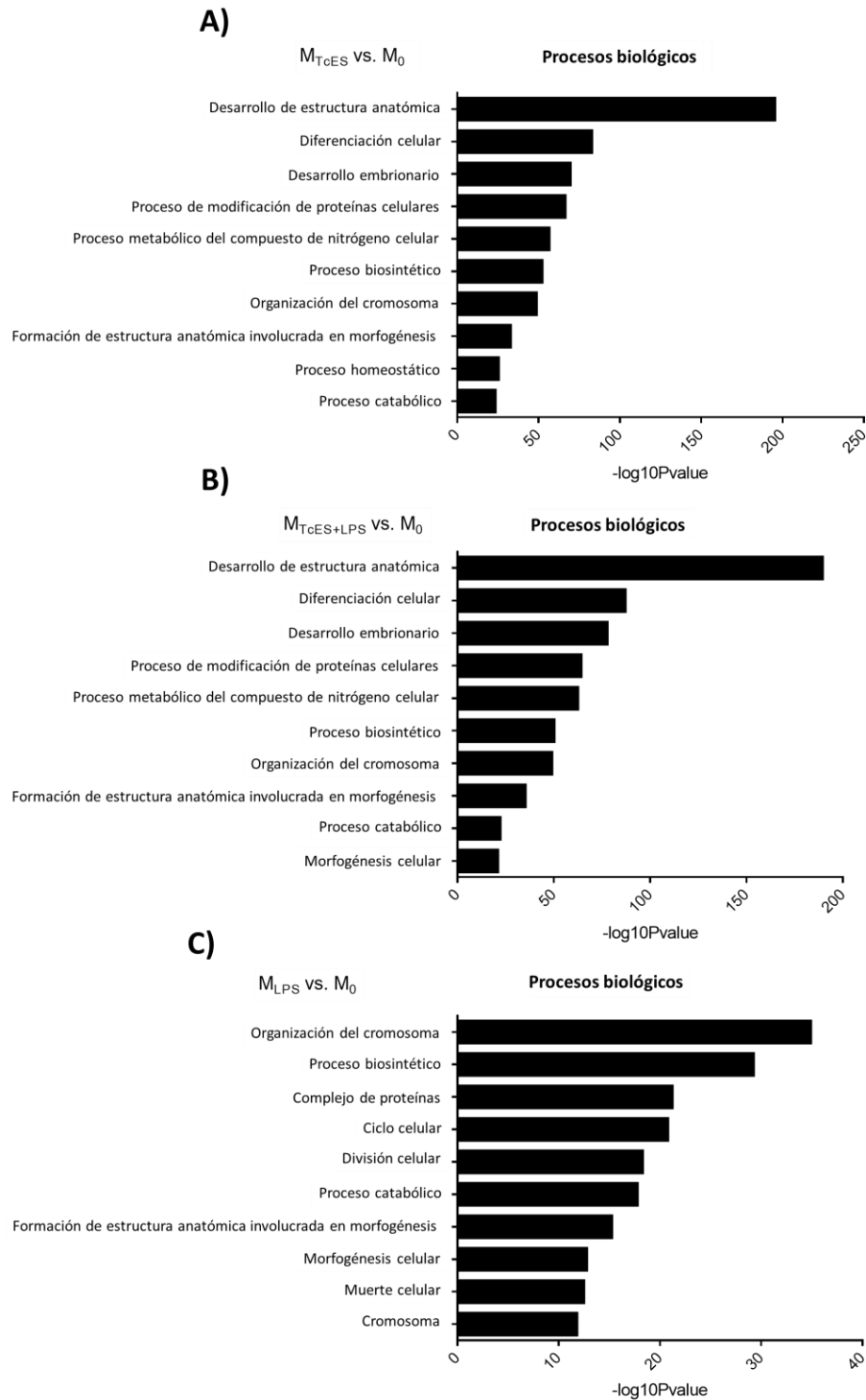
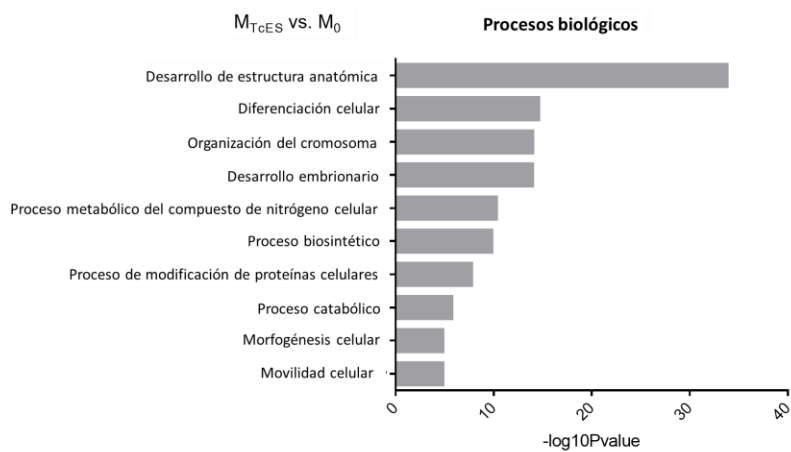


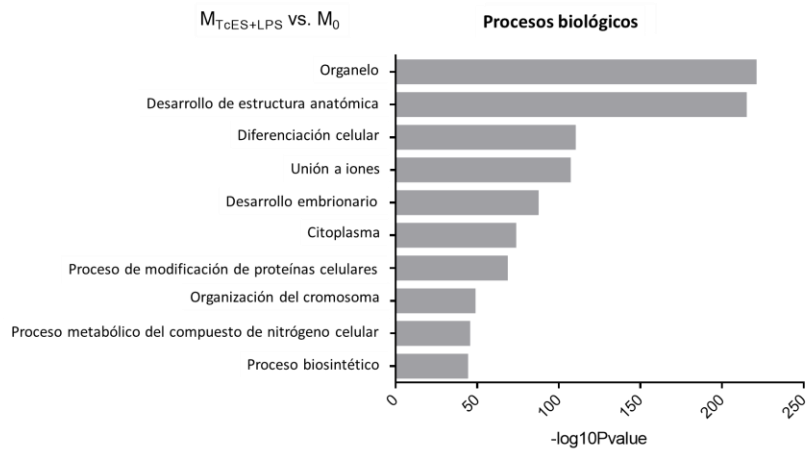
Figura 19. Top 10 de procesos biológicos de las anotaciones GO en M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} a las 4 h posestímulos. Proceso biológico enriquecidos por los niveles diferenciales de RNAm entre M_{TcES} vs M_0 (A), $M_{TcES+LPS}$ vs M_0 (B) y M_{LPS} vs M_0 (C) a las 4 h posestímulo.

24 h posestímulo

A)



B)



C)

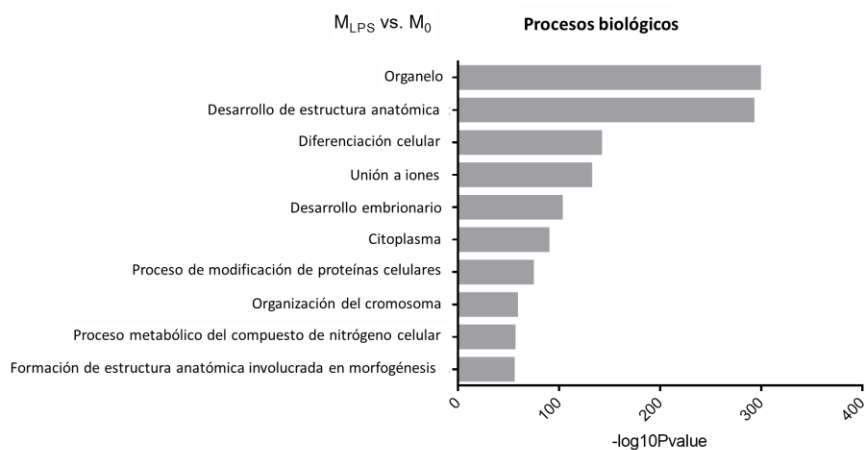


Figura 20. Top 10 de procesos biológicos de las anotaciones GO en M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} a las 24 h posestímulo. Proceso biológico enriquecidos por los niveles diferenciales de RNAm entre M_{TcES} vs M_0 (A), $M_{TcES+LPS}$ vs M_0 (B) y M_{LPS} vs M_0 (C) a las 24 h posestímulo.

Continuando, el análisis de las vías KEGG reveló que a las 4 h posestímulo los microRNA acumulados regularían RNAm asociados a glioma, leucemia mieloide crónica y la señalización de TGF- β en M_{TcES} (Figura 21A); proteólisis mediada por ubiquitina, y las vías de señalización de p53 y GhRH en $M_{TcES+LPS}$ (Figura 21B); y cáncer de próstata, biosíntesis de esteroides y la vía de señalización de FoxO en M_{LPS} (Figura 21C). A las 24 h posestímulo, los microRNA regularían RNAm asociados a la guía del axón y vías de señalización de la insulina en los $M_{TcES+LPS}$ (Figura 22A); y el metabolismo fosfato inositol, vías de cáncer y de la insulina en M_{LPS} (Figura 22B). Para más detalles del análisis de enriquecimiento GO y las vías KEGG referirse al Apéndice 10.11 y 10.12. Estos datos sugieren que los TcES inducen microRNA que regulan importantes vías metabólicas, de señalización celular e inflamación en los MDMO estimulados con LPS.

Después, validamos la producción 4 microRNA por RT-qPCR (miR-125a-5p, miR-762, miR-484 y miR-155-5p), ya que análisis previos y nuestro análisis bioinformático muestran que están involucrados en la regulación de RNAm asociados a inflamación. A las 4 h posestímulo, encontramos que la acumulación del miR-125a-5p aumentó en los M_{LPS} y M_{TcES} , mientras que la exposición a los TcES y LPS produjo un aumento significativo respecto a los otros grupos. A las 24 h posestímulo, su acumulación se mantuvo en los M_{LPS} y $M_{TcES+LPS}$ (Figura 23A). Este microRNA se ha asociado con reducir la producción de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF α ¹⁸⁷. Por otro lado, la acumulación del miR-762 aumentó en M_{TcES} y $M_{TcES+LPS}$ a las 4 h posestímulo, y en los M_{LPS} a las 24 h posestímulo (Figura 23B); este microRNA hace blanco en *Irf7*, asociado a respuesta inflamatoria¹⁸⁸. Continuando, el miR-484 aumentó su acumulación en los M_{TcES} comparado con los $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} en ambos tiempos posestímulo (Figura 23C). Nuestro análisis bioinformático sugiere que el miR-484 hace blanco potencialmente en *Nfkb*, *Stat5a*, *Irf1*, *Myd88*, *Stat1*, y *Il12a*. Finalmente, el miR-155-5p, un microRNA característico de los macrófagos M_{LPS} , aumentó su acumulación en los M_{LPS} y $M_{TcES+LPS}$ respecto a los M_{TcES} a las 4 y 24 h posestímulo (Figura 23D). El perfil de estos microRNA fue comparable con los observados durante el arreglo de microRNA. En conjunto, nuestros resultados sugieren un papel para los miR-125a-5p, miR-762 y miR-484 en la modulación inmune de los TcES en los MDMO.

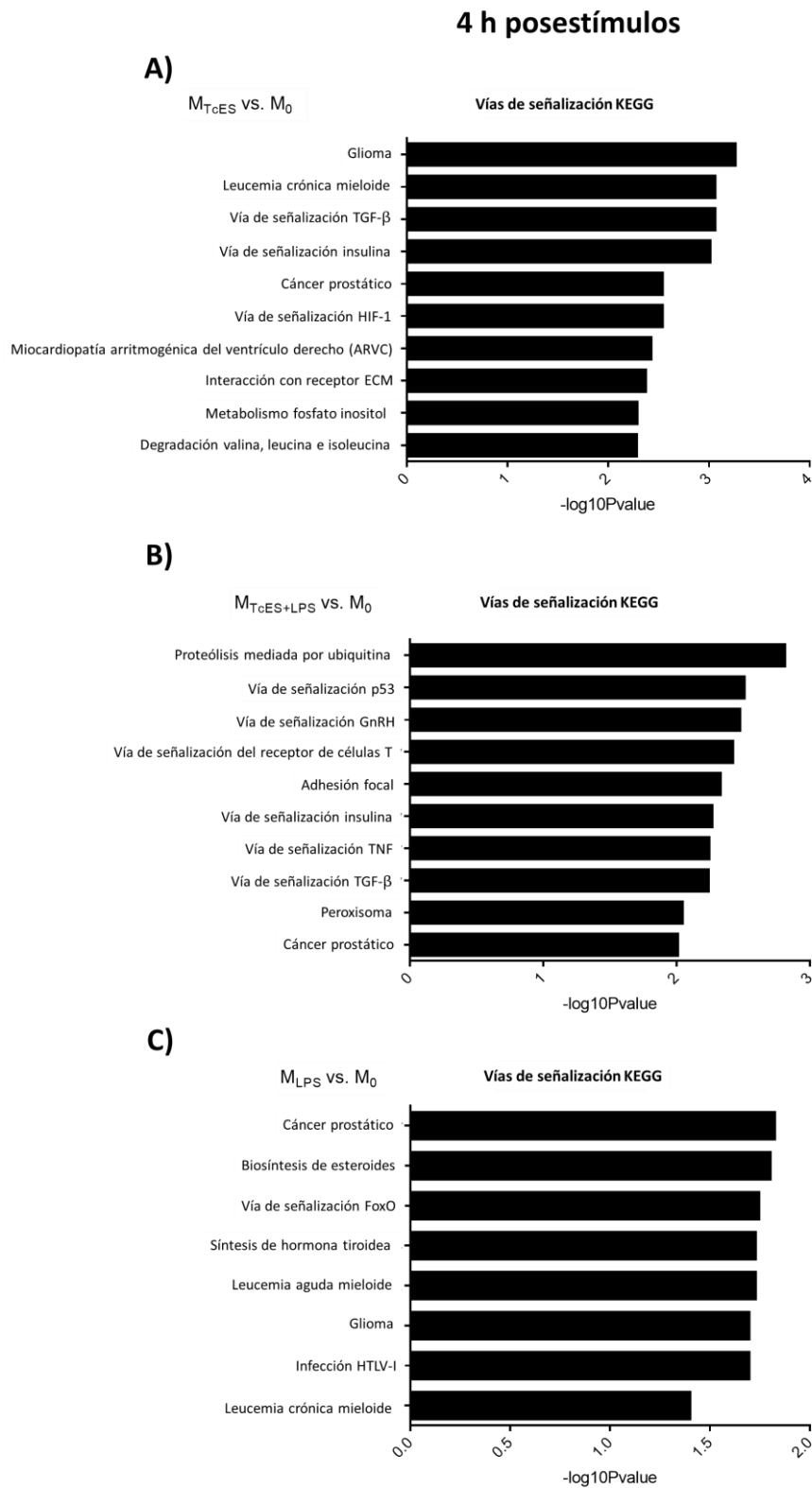
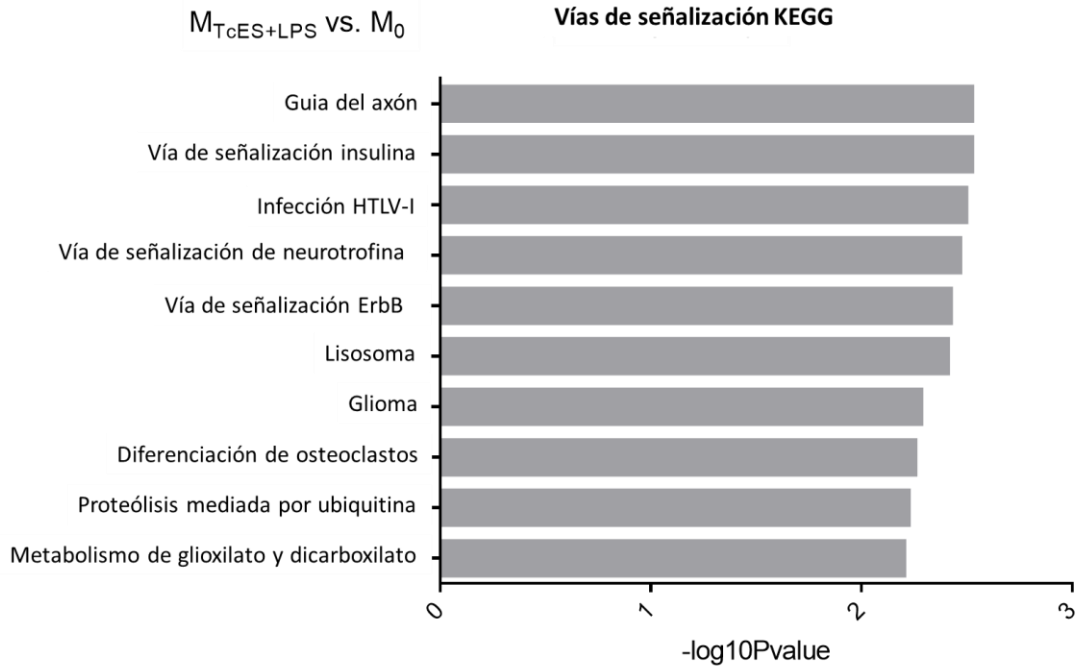


Figura 21. Top 10 de vías de señalización KEGG en M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} a las 4 h posestímulos. Vías KEGG enriquecidas por los niveles diferenciales de RNAm entre M_{TcES} vs M_0 (A), $M_{TcES+LPS}$ vs M_0 (B) y M_{LPS} vs M_0 (C) a las 4 h posestímulo.

24 h posestímulos

A)



B)

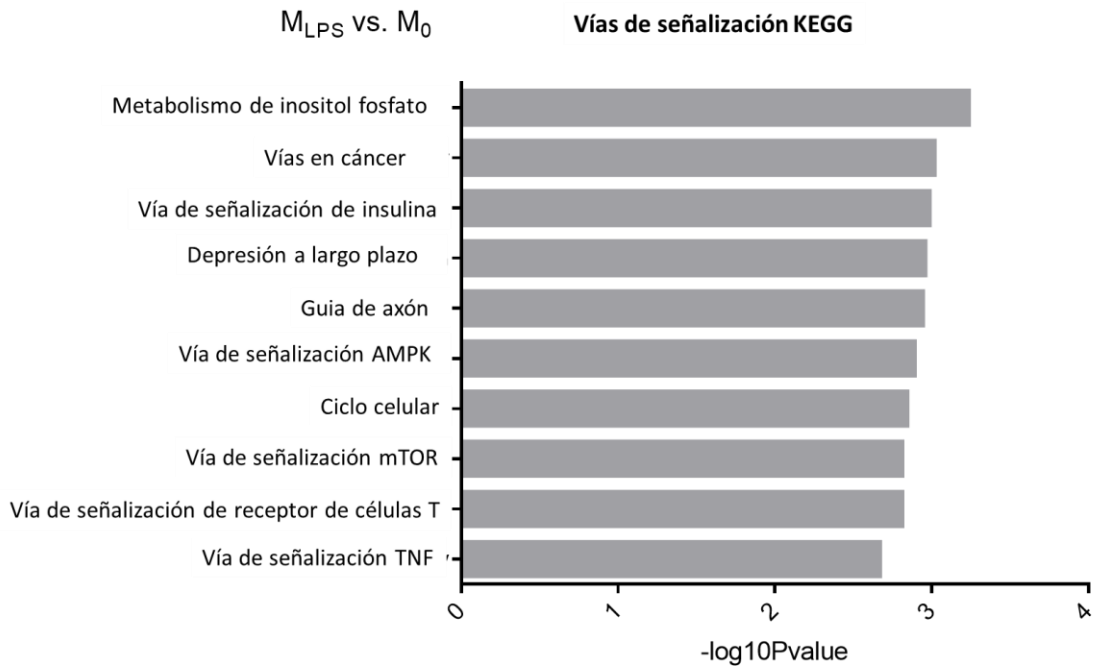


Figura 22. Top 10 de vías de señalización KEGG en M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} a las 24 h posestímulos. Vías KEGG enriquecidas por los niveles diferenciales de RNAm entre $M_{TcES+LPS}$ vs M_0 (A) y M_{LPS} vs M_0 (B) a las 24 h posestímulo.

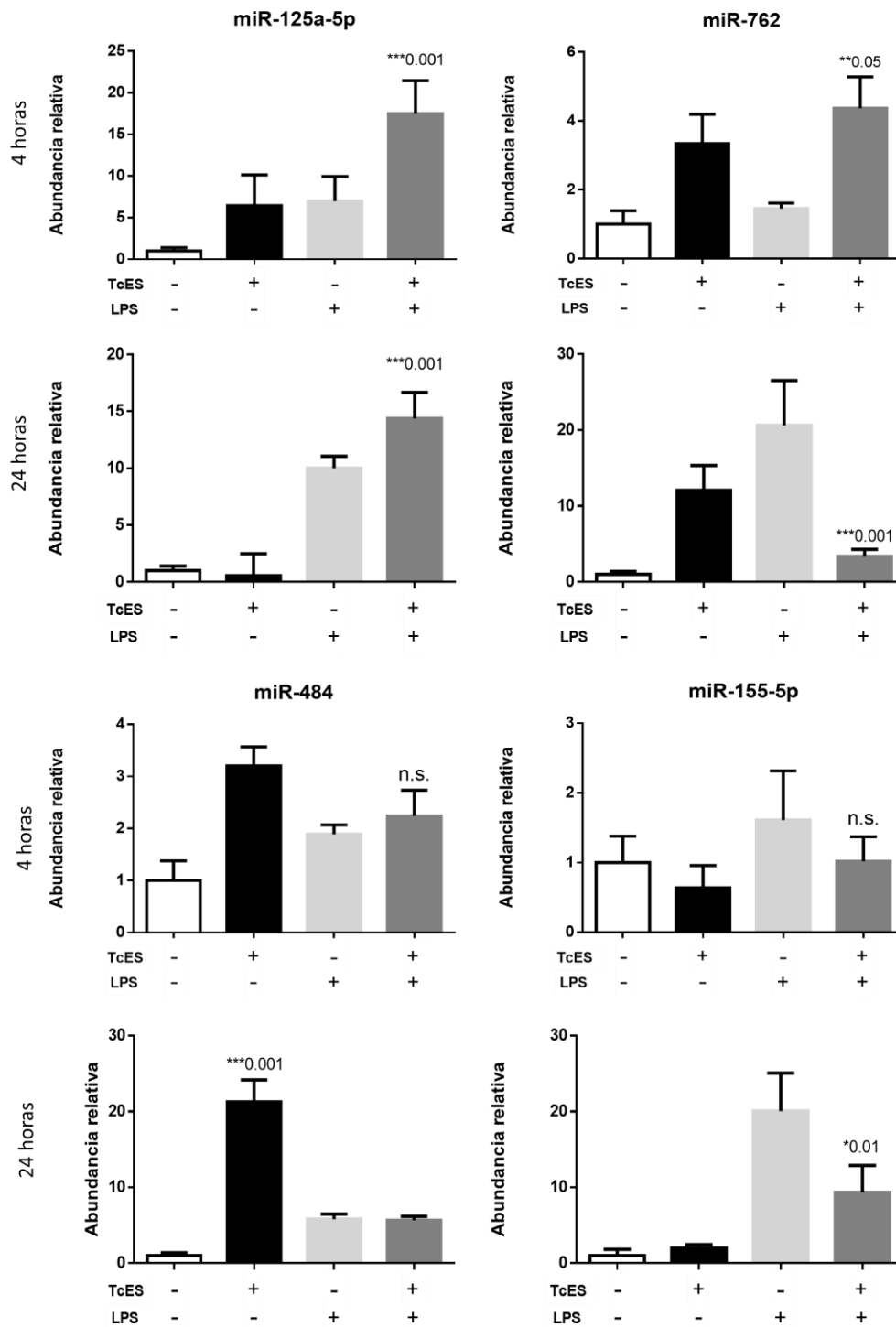


Figura 23. Validación e identificación de microRNA en los MDMO estimulados. Los macrófagos se cultivaron con TcES (25 $\mu\text{g/ml}$), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) o una combinación de TcES+LPS durante 4 (arriba) o 24 h postestímulos (abajo). Los niveles relativos de los microRNA seleccionados se determinó utilizando el ensayo de TaqMan miRNA después de normalizar utilizando al RNA 18s. Los valores de los microRNA están dados en FC (veces de cambios) relativos al tratamiento de MDMO con PBS (FC \pm SD). Los datos mostrados son una representación de dos experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el perfil de expresión de los microRNA en macrófagos inflamatorios expuestos a los TcES *in vitro* y, además, se determinó que los TcES disminuyen la producción de las citocinas asociadas a inflamación IL-6, IL-12 y TNF α , y de NO, aunque aumenta la acumulación de RNAm asociados a inflamación. Los datos obtenidos muestran que los microRNA son uno de los mecanismos por el que los TcES regulan la respuesta de los macrófagos en ambientes inflamatorios.

Primero, para saber si en este modelo se disminuía la producción de citocinas asociadas a inflamación en macrófagos expuestos a los TcES, al igual que en los modelos *in vivo*^{39,40}, medimos la producción de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF α , así como de la citocina asociada a regulación IL-10 en MDMO expuestos solo TcES o a TcES y LPS. Observamos que en los M_{LPS}, los TcES aumentaron la producción de IL-10 y redujeron a IL-6, IL-12 y TNF α . Recientemente, se reportó que los ES de los helmintos *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni*, *Spirometra erinaceieuropaei* e *Hymenolepis diminuta* también reducen la producción de citocinas asociadas a inflamación y, por tanto, la subsecuente inflamación¹⁸⁹⁻¹⁹⁸, probando que los TcES y otros ES de helmintos regulan negativamente la producción de citocinas inflamatorias el hospedador.

Después, utilizamos RT-qPCR para analizar los niveles de los RNAm *Il6*, *Il10*, *Il12b* y *Tnf* a las 4 h y 24 h postestímulo. Para nuestra sorpresa, observamos que hubo una alta acumulación del RNAm *Il10* en el M_{LPS} a las 4 h y 24 h postestímulo, pero dicha acumulación no coincide con la producción de la IL-10. Esto podría deberse al aumento en la acumulación del miR-155-5p que observamos mediante el arreglo y RT-qPCR, ya que el miR-155-5p es un inhibidor de la IL-10^{170,199}, por lo que a pesar de la acumulación de su RNAm, no dejaría que se tradujera a citocina, explicando así lo que observamos en los M_{LPS}. En línea con esto, en los M_{TcES+LPS} la acumulación del RNAm *Il10* aumenta junto con la producción de IL-10, mientras disminuye la acumulación del miR-155-5p a las 24 h postestímulo. Por otro lado, observamos el aumento en la acumulación del RNAm *Il6* en los M_{TcES+LPS} a las 24 h postestímulo, pero no así de la producción de la citocina, lo que podría

deberse a la acumulación del miR-125a-5p, que lo tiene como blanco^{150,187,200,201}. Un fenómeno similar se reportó con los ES de *Acanthocheilonema vitea*: la producción de TNF α se redujo sin que su RNAm *Tnf* se alterara¹⁹². Sin embargo, no indagaron en el mecanismo por el que podría estar ocurriendo.

Ya que la producción de citocinas es alterada por los TcES, quisimos saber si también el óxido nítrico (NO). Si bien el NO es esencial para la respuesta antipatógenos de los macrófagos M1, la exposición prolongada a este producto daña severamente los tejidos del hospedador, por lo que durante patologías de inflamación crónica es un problema^{7,202}. En nuestros resultados, observamos que los TcES inhiben la producción de NO, disminuye la acumulación del RNAm *Nos2*, pero no los niveles de NOS2, enzima necesaria para su síntesis en los macrófagos estimulados con LPS a las 24 h postestímulo. Estos resultados nos sugieren que, la inhibición en la producción de NO sin que sea efecto de la disminución en la producción de NOS2 podría deberse a factores de virulencia presentes en los TcES que aún necesitan ser identificados e investigados en *T. crassiceps* y otros parásitos²⁰³⁻²⁰⁷.

Por otro lado, como esperábamos, los niveles de ARG1 aumentaron en los M_{IL-4} desde las 4 h postestímulo⁵⁷. Sin embargo, los TcES no modificaron la producción de ARG1. Lo anterior concuerda con un estudio en el que los productos tegumentales de *Fasciola hepatica* tampoco inducen la producción de moléculas asociadas a los macrófagos M2 *in vitro*, pero sí *in vivo*²⁰⁸. La producción de moléculas canónicas M2, como la ARG1, ha sido reportada como dependiente de la IL-4, la cual es producida por las células T tipo T_{H2}, células T *natural killer* (NK) y basófilos, pero no por macrófagos²⁰⁹⁻²¹¹. Si bien, el estímulo de los ES de los helmintos solos no es suficiente para inducir la polarización funcional de los MDMO a un perfil M2, sí lo es para modificar negativamente las propiedades inflamatorias de estas células. Por lo tanto, los TcES no inducen la producción de moléculas asociadas a macrófagos M2, pero sí contrarrestan la respuesta inflamatoria en los macrófagos *in vitro*.

Debido a que la acumulación de RNAm de las citocinas nos mostró que diferían de la producción de estas, pero no sabíamos si podía deberse a cambios en las vías de señalización de estas citocinas y no a

microRNA, medimos otros RNAm asociados a inflamación. Utilizamos la técnica de arreglos (nCounter Inflammation Panel, NanoString mRNAs) para determinar estos posibles cambios. De los 248 RNAm asociados a inflamación que medimos, como esperábamos, pocos aumentaron en los M_{TcES} comparados con los M_{LPS} a las 4 h (42 vs. 120 RNAm, respectivamente) y 24 h posestímulos (36 vs. 104 RNAm, respectivamente). De estos, los RNAm acumulados en los M_{TcES} se asocian a la fagocitosis, macrófagos M2 y respuesta antiinflamatoria. Por ejemplo, incrementó la acumulación del RNAm *Pkca*, cuyo producto es una enzima para la biogénesis de los fagolisosomas²¹². Además, aumentó la acumulación de los RNAm *Irf3*, *C1s* y *Ptgs*, cuyas proteínas se han asociado con microambientes antiinflamatorios y macrófagos M2²¹³⁻²²⁰. A pesar de que nuestros resultados sugieren que los TcES inducen la acumulación de RNAm asociados a macrófagos M2, el estímulo con los TcES no es suficiente para inducir la producción de todos los marcadores M2 en macrófagos, tal como otros han reportado²⁰⁸.

Si bien los M_{TcES} y $M_{TcES+LPS}$ compartieron incrementos en la acumulación de RNAm, nosotros pensamos que serían más los compartidos entre estos grupos. Los RNAm compartidos fueron *Irf3*, *Defa1*, *C1s* e *Ifna1* a las 4 h; y RNAm *Hspb1*, *Maff* y *Map2k6* a las 24 h posestímulos. La acumulación de los RNAm *Irf3* y *C1s* sugiere un perfil tipo macrófago M2; la del *Ifna1* que los TcES podrían ser reconocidos por los TLR3, TLR7/8 o TLR9^{221,222}; y la del *Defa1* sugiere la inhibición de la respuesta inflamatoria en macrófagos, ya que este transcrito codifica a la proteína HNP1, la cual tiene como blanco a citocinas asociadas a inflamación y NO^{223,224}. Finalmente, notamos el aumento en la acumulación del RNAm *Tlr2* en los $M_{TcES+LPS}$ a las 24 h posestímulo, lo cual podría relacionarse con el reconocimiento de los TcES, ya que previamente se reportó que TLR2 reconoce a TcES²²⁵. Los resultados sugieren que, aunque los TcES no inducen una activación canónica de los macrófagos tipo M2, sí inducen muchos de los RNAm que los ayudan a contrarrestar la inflamación. Por otra parte, no esperábamos que los $M_{TcES+LPS}$ y M_{LPS} compartieran más de 60 RNAm asociados a inflamación a las 4 h y 24 h posestímulos. Sin embargo, sí la disminución en la acumulación de RNAm asociados a inflamación en los $M_{TcES+LPS}$ como *Nox1*, *Ccl21a*, *Ccr4* y *Cxcr2* comparado con los M_{LPS} a las 24 h posestímulo.

Los microRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificantes fundamentales para las funciones de las células. Estas moléculas pueden silenciar la traducción de los RNAm a través del apareamiento de bases con secuencias complementarias en los RNAm²²⁶. En la última década, se ha descrito que son esenciales para la diferenciación de los macrófagos a sus diferentes perfiles de activación, así como en la respuesta de estas células a ES de helminto^{90,110,172,173,186}. Por consiguiente, analizamos el perfil de microRNA en los MDMO inflamatorios expuestos a los TcES.

Nuestro análisis muestra que los M_{TcES+LPS} y M_{LPS} comparten la acumulación de microRNA que tiene como blanco vías inflamatorias. Por ejemplo, el miR-146a-5p aumentó en ambos grupos a las 4 h, pero solo en los M_{TcES+LPS} a las 24 h postestímulo; este microRNA tiene como blanco a los RNAm *Traf6*, *Irak1*, *Irak2*, *Nfkb*, *Stat1* y *Ap1*, los cuales forman parte de las vías de señalización de los TLR, NF-κB y STAT1^{133,227-229}. Lo anterior también es apoyado por el análisis de enriquecimiento KEGG que hicimos, el cual indica que parte de los blancos están en las vías de NF-κB, TNF y MAPK (Figura 21 y 22). Si bien esperábamos la acumulación de este tipo de microRNA en los M_{LPS}, como parte de la retroalimentación negativa necesaria para evitar la sobreactivación de la respuesta inflamatoria^{155,166,230}, notamos que la regulación inducida por los TcES es más evidente y fuerte, demostrando que los TcES inducen microRNA que tiene como blanco vías asociadas a inflamación.

Como prueba de lo anterior, los M_{TcES+LPS} tuvieron mayor la acumulación de los let-7i y let-7e, los cuales tienen como blanco al RNAm *Tlr4*, ocasionando que se reduzca el reconocimiento de antígenos^{146,231,232}; también aumentaron al miR-24-3p, el cual reduce la producción de IL-6 y TNFα en macrófagos²³³. Asimismo, la producción de los miR-146a-5p, miR-365-3p y miR-24-3p en los M_{TcES+LPS} y M_{TcES} ha sido reportada previamente en macrófagos expuestos a los ES de *E. multilocularis* y *S. japonicum*^{173,234}. Estos resultados confirman que los TcES inducen microRNA que tienen como blanco vías asociadas a inflamación y que hay moléculas conservadas en los ES de los helmintos que inducen los mismos microRNA para modular negativamente la respuesta inflamatoria del hospedador.

Por último, seleccionamos 4 microRNA para validar su acumulación mediante RT-qPCR que previamente han sido reportados que tienen como blanco RNAs asociados a inflamación. La acumulación del miR-125a-5p aumentó en los M_{TcES} y M_{LPS}. Sin embargo, el estímulo combinado de los TcES y LPS indujo un efecto aditivo en la producción de este microRNA a las 4 h postestímulo. La maduración del miR-125a-5p aumenta después de la señalización a través de TLR2/TLR4 y es fundamental para reducir los niveles de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF α , ya que hace blanco en las vías de NF- κ B y KFL4, funcionando como un bucle de retroalimentación negativa^{150,187,200,201}. La señalización de los TcES a través de TLR2 en células fagocíticas fue previamente descrito en nuestro equipo de trabajo^{225,235}.

Continuamos con el miR-762 que aumentó en los M_{TcES} y M_{TcES+LPS} a las 4 h postestímulo. El miR-762 ha sido reportado con aumentos en su acumulación en cáncer de mama y ovario, y tejido ocular, sitios en los que los macrófagos se diferencian a M2²³⁶⁻²⁴⁰. Además, usando las herramientas bioinformáticas encontramos que *Il12b*, *Il6*, *Tnf*, *Nfkb* y *Cd86* son posibles blancos de este microRNA en los M_{TcES} y M_{TcES+LPS}. Lo anterior, nos sugiere que participaría en la supresión de RNAs asociados a inflamación en macrófagos M1.

El miR-484 aumentó en todos los grupos de MDMO a las 4 h postestímulo. Sin embargo, su producción se mantuvo solo en los M_{TcES} a las 24 h postestímulo. El miR-484 ha sido identificado en múltiples tipos de cáncer y en el córtex cerebral, ambientes en los que se activan los macrófagos a M2²⁴¹⁻²⁴⁶. Nuestro análisis bioinformático muestra que los RNAs *Il1b*, *Nfkb*, *Stat5a*, *Irf1*, *Myd88*, *Stat1* e *Il-12a* son posibles blancos del miR-484, lo que sugiere una función en la tolerancia inmune.

Finalmente, el miR-155-5p se ha reportado que se produce en macrófagos estimulados con LPS y se sabe que mejora la respuesta inflamatoria al hacer blanco en las moléculas reguladoras del sistema inmune como los RNAs de *Ship1*, *Socs1*, *Il13ra* y *C/ebp β* , así como por aumentar la vida media del RNA *Tnf*^{146,175,176,230,247-249}. Como esperábamos, el miR-155-5p se produjo en los M_{LPS}, pero también en los M_{TcES+LPS} a las 24 h postestímulo, aunque en estos la acumulación es significativamente menor con respecto a los primeros. La producción tardía en los M_{TcES+LPS} podría deberse a que el miR-155-5p funciona también en un bucle de retroalimentación negativa en macrófagos inflamatorios^{247,250,251}. Además, los productos de

Angiostrongylus cantonensis también inducen la producción del miR-155-5p²⁵², por lo que sería interesante estudiar más la función del miR-155-5p durante la exposición a ES de helmintos.

Nuestros resultados nos permiten proponer que en los M_{TcES+LPS}, los LPS son reconocidos por TLR4, el cual se dimeriza y recluta a las moléculas adaptadoras TIRAP y MyD88, con lo que se inicia la respuesta inflamatoria. Una vez activado, MyD88 activa a las proteínas IRAK1, IRAK2 e IRAK4, que activan a TRAF6 y este a TAK1, TAB2 y TAB3; estos últimos, activan al complejo IKK, con lo cual se activa NF-κB, que transloca al núcleo para transcribir los RNAm *Tnf*, *Il6*, *Il12a* e *Il12b* (Figura 24)^{54,249}. Sin embargo, los TcES son reconocidos por TLR2^{225,235}, induciendo una vía de señalización, aún desconocida, que activaría la transcripción y maduración de microRNA como miR-125a-5p, el cual tiene como blancos a los RNAm *Il6*, *Il12a*, *Tnf* y *Tlr4* (Figura 24). El miR-762 también hace blanco sobre estos RNAm y, junto con el miR-484, en el RNAm *Nfkb*. Además, el miR-484 tiene como blanco a los RNAm *Myd88*. Finalmente, la producción de IL-10 inhibe al miR-155-5p de manera dependiente a STAT3, con lo cual SHIP1 se liberaría e inhibiría a STAT1^{42,170}. Además, de estos microRNA, otros acumulados, pero que no comprobamos su expresión tienen como blanco RNAm de la vía de TLR4, como el miR-146a-5p que tiene como blanco al RNAm *Irak4*, y otras vías en las que sería importante explorar su función.

También consideramos que nuestros resultados apuntan a que los TcES dependen de la activación de las vías inflamación para que sus moléculas asociadas a regulación sean transcritas o adquieran función, incluyendo a los microRNA.

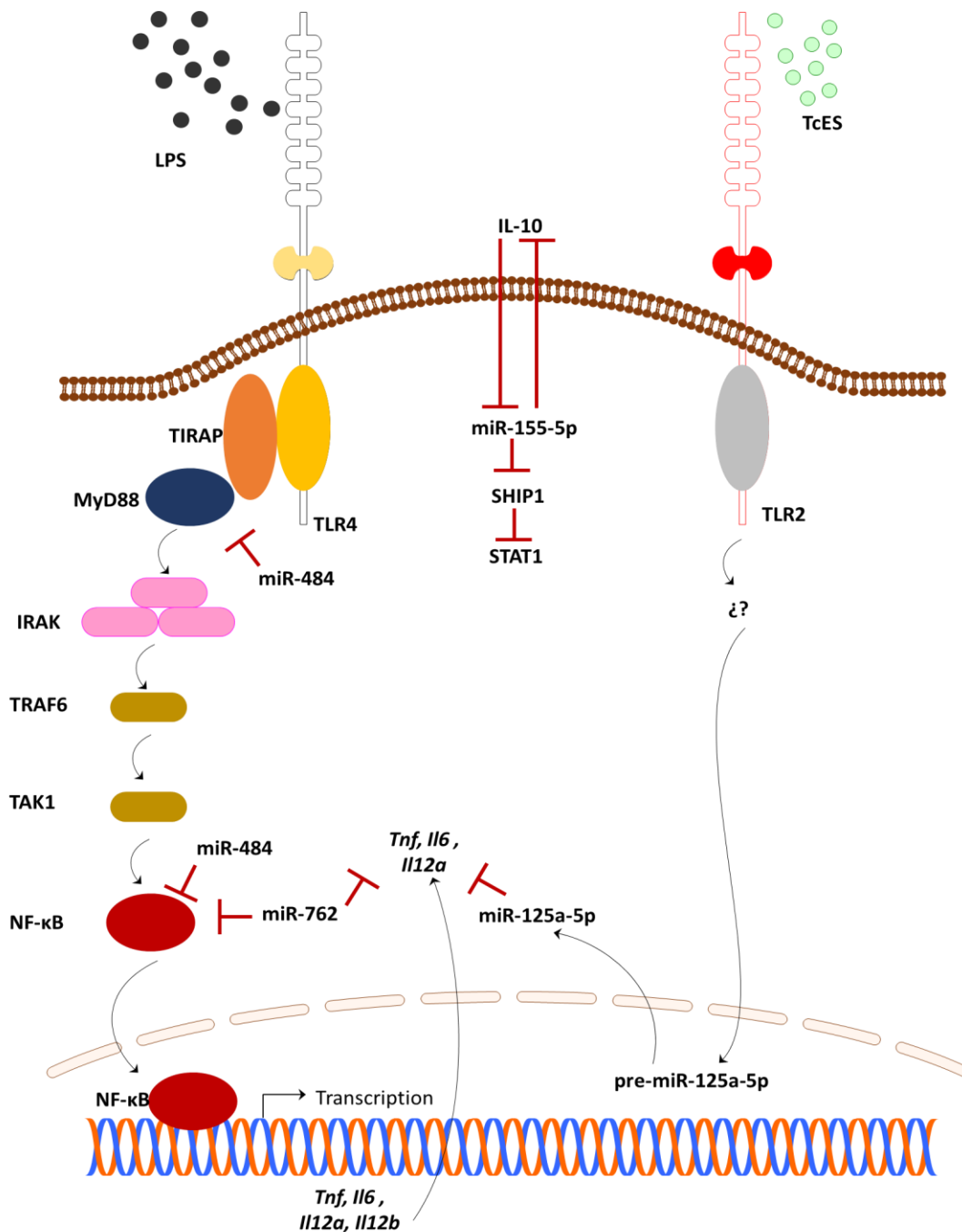


Figura 24. Modelo hipotético de la vía de señalización inducida en macrófagos $M_{TcES+LPS}$. Los LPS son reconocidos por el TLR4, el cual se dimeriza y recluta a TIRAP y MyD88 para iniciar la respuesta inflamatoria. Ya activada, MyD88 activa a las proteínas IRAK, que activan a su vez a TRAF6, TAK1 y, por último, a NF- κ B, el cual transloca al núcleo y transcribe a genes asociados a inflamación como *Tnf*, *Il6*, *Il12a* e *Il12b*. Los TcES serían reconocidos por TLR2, induciendo una vía de señalización aún desconocida que llevaría a la transcripción del miR-125a-5p, el cual tiene como blanco a los RNAm *Il6*, *Il12a*, *Tnf* y *Tlr4*. El miR-762 también haría blanco sobre estos microRNA y, junto con miR-484, en *NfκB*. Además, el miR-484 tiene como blanco a *Myd88*. Por último, la citocina IL-10 bloquea la transcripción del miR-155-5p, el cual tiene como blanco a *Ship1*, por lo que SHIP1 se traduce y bloquea la actividad de STAT1. Diagrama esquemático hecho con PPT-Toolkit-Immunology, Motifolio, Inc., Ellicott City, MD, USA.

En resumen, nuestro trabajo demuestra que, si bien los TcES inhiben la producción de NO, esto es independiente de la producción de la enzima NOS2 en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) estimulados con los LPS, por lo que podría estar asociados factores de virulencia del parásito. También que los TcES no son suficientes para inducir la expresión de ARG1 en MDMO. Por último, que los TcES, en macrófagos, disminuyen la producción de las citocinas asociadas a inflamación IL-6, IL-12 y TNF α , a través de la inducción de microRNA como el miR-125-5p, miR-762 y miR-484, los cuales tienen como blanco RNAm asociados con las vías de señalización de estas citocinas y otras vías inflamatorias. Lo anterior, modifica la acumulación de RNAm asociados a inflamación, pero también aumenta la de RNAm asociados a fagocitosis, macrófagos M2 y respuesta antiinflamatoria. Estos resultados están también apoyados por nuestro análisis *in silico*. En conjunto, los microRNA moldean el perfil del transcriptoma de los macrófagos y por consecuencia, determinan cómo será la respuesta inmune del hospedador.

Aunque este trabajo no demuestra de manera directa la interacción entre los microRNA y los RNAm, sí encontramos una clara asociación entre los microRNA inducidos por los TcES y los RNAm involucrados en múltiples vías inflamatorias como sus blancos. Los próximos estudios que se hagan en el laboratorio al respecto deberán enfocarse en encontrar los blancos y funciones de los microRNA aquí descritos en los M_{TcES+LPS}. Lo anterior con el fin de, en un futuro, utilizar los microRNA inducidos por los TcES como tratamiento en enfermedades autoinmunes. Finalmente, los hallazgos aquí presentados aumentan nuestro entendimiento de cómo los productos ES de los helmintos regulan negativamente la inflamación y ofrecen un nuevo acercamiento al tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias en un futuro cercano.

8. CONCLUSIONES

- La exposición a los TcES inhibe la producción de NO de manera independiente a la disminución de la enzima NOS2 en macrófagos estimulados con LPS.
- La exposición a los TcES no induce la producción de ARG1 en macrófagos estimulados con LPS.
- Los macrófagos expuestos a los TcES y LPS aumentan la acumulación de RNAm asociados a inflamación, fagocitosis, macrófagos M2 y respuesta antiinflamatoria.
- La exposición a los TcES aumenta la producción de la citocina IL-10 en macrófagos estimulados con LPS.
- La exposición a los TcES conlleva a la acumulación de los RNAm *Il6*, *Il12b* y *Tnf*. Sin embargo, los niveles de sus proteínas estaban disminuidas en macrófagos estimulados con LPS.
- La exposición a los TcES aumenta la acumulación de miR-125a-5p, miR-762 y miR-484 en macrófagos estimulados con LPS, los cuales tienen como blanco a RNAm asociados a vías inflamatorias.
- La exposición a los TcES disminuye la producción de las citocinas asociadas a inflamación IL-6, IL-12 y TNF α , lo cual sería a través de la inducción de microRNA como miR-125-5p, miR-762 y miR-484, quienes tienen como blanco RNAm asociados a las vías de señalización de estas citocinas y otras vías inflamatorias.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Culbreth, K. L., Esch, G. W. & Kühn, R. E. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda): III. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of ¹⁴C-leucine. *Exp. Parasitol.* **32**, 272–281 (1972).
2. Willms, K. & Zurabian, R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* **137**, 335–346 (2010).
3. Esch, G. W. & Smyth, J. D. Studies on the in vitro culture of *Taenia crassiceps*. *Int. J. Parasitol.* **6**, 143–149 (1976).
4. Morales-Montor, J., Escobedo, G., Vargas-Villavicencio, J. & Larralde, C. *The Neuroimmunoendocrine Network in the Complex Host-Parasite Relationship During Murine Cysticercosis. Current topics in medicinal chemistry* **8**, (2008).
5. Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T. & Larralde, C. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* **84**, 74–81 (1998).
6. Maizels, R. M. & McSorley, H. J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 666–675 (2016).
7. Guzik, T., Korbut, R. & Adamek-Guzik, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469–87 (2003).
8. Reyes, J. L. *et al.* Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. *Int. J. Parasitol.* **40**, 731–742 (2010).
9. Peón, A. N., Espinoza-Jiménez, A. & Terrazas, L. I. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed Res. Int.* **2013**, 13 (2013).
10. Rodríguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R. & Terrazas, L. I. Cutting Edge: Susceptibility to the Larval Stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* Is Mediated by Th2 Response Induced Via STAT6 Signaling. *J. Immunol.* **168**, 3135 LP – 3139 (2002).
11. Rodríguez-Sosa, M. *et al.* Chronic Helminth Infection Induces Alternatively Activated Macrophages Expressing High Levels of CCR5 with Low Interleukin-12 Production and Th2-Biasing Ability. *Infect. Immun.* **70**, 3656–3664 (2002).
12. Reyes, J. L. & Terrazas, L. I. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol.* **29**, 609–619 (2007).
13. Jenkins, S. J. & Allen, J. E. Similarity and Diversity in Macrophage Activation by Nematodes, Trematodes, and Cestodes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 262609 (2010).
14. Johnston, C. J. C., McSorley, H. J., Anderton, S. M., Wigmore, S. J. & Maizels, R. M. Helminths and Immunological Tolerance. *Transplantation* **97**, 127–132 (2014).
15. Maizels, R. M. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 481–486 (2016).
16. Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A. F., González, M. I., Verdin, L. & Terrazas, L. I. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* **267**, 77–87 (2011).

17. León-Cabrera, S. *et al.* Extraintestinal Helminth Infection Reduces the Development of Colitis-Associated Tumorigenesis. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 948–956 (2014).
18. Gruden-Movsesijan, A. *et al.* Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunol.* **32**, 450–459 (2010).
19. Walsh, K. P., Brady, M. T., Finlay, C. M., Boon, L. & Mills, K. H. G. Infection with a Helminth Parasite Attenuates Autoimmunity through TGF- β -Mediated Suppression of Th17 and Th1 Responses. *J. Immunol.* **183**, 1577 LP – 1586 (2009).
20. Moreels, T. G. *et al.* Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut* **53**, 99–107 (2004).
21. Reyes, J. L. *et al.* IL-22 Restrains Tapeworm-Mediated Protection against Experimental Colitis via Regulation of IL-25 Expression. *PLoS Pathog.* **12**, e1005481 (2016).
22. Saunders, K. A., Raine, T., Cooke, A. & Lawrence, C. E. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. *Infect. Immun.* **75**, 397–407 (2007).
23. Espinoza-Jiménez, A. F., Rivera-Montaya, I., Cárdenas-Arreola, R., Morán, L. & Terrazas, L. I. *Taenia crassiceps* Infection Attenuates Multiple Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 11 (2010).
24. He, Y. *et al.* The inhibitory effect against collagen-induced arthritis by *Schistosoma japonicum* infection is infection stage-dependent. *BMC Immunol.* **11**, 28 (2010).
25. Marcilla, A. *et al.* Extracellular vesicles in parasitic diseases. *J. Extracell. Vesicles; Vol 3 incl Suppl.* (2014).
26. Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L. & Rodríguez-Sosa, M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1349–58 (2005).
27. Terrazas, C. *et al.* Helminth-induced Ly6Chi monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci. Rep.* **7**, 408–414 (2017).
28. Smallwood, T. B. *et al.* Helminth Immunomodulation in Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology* **8**, 453 (2017).
29. Mulvenna, J. *et al.* Proteomics Analysis of the Excretory/Secretory Component of the Blood-feeding Stage of the Hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Mol. & Cell. Proteomics* **8**, 109 LP – 121 (2009).
30. Leea, J. J. *et al.* Mass spectrometric characterisation of *Taenia crassiceps* metacestode N-glycans. *Mol. Biochem. Parasitol.* **143**, 245–249 (2005).
31. Rzepecka, J. *et al.* Prophylactic and therapeutic treatment with a synthetic analogue of a parasitic worm product prevents experimental arthritis and inhibits IL-1 β production via NRF2-mediated counter-regulation of the inflammasome. *J. Autoimmun.* **60**, 59–73 (2015).
32. Rodgers, D. T., Pineda, M. A., Suckling, C. J., Harnett, W. & Harnett, M. M. Drug-like analogues of the parasitic worm-derived immunomodulator ES-62 are therapeutic in the MRL/Lpr model of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **24**, 1437–1442 (2015).
33. Veenstra, A. A., Tang, J. & Kern, T. S. Antagonism of CD11b with neutrophil inhibitory factor (NIF) inhibits vascular lesions in diabetic retinopathy. *PLoS One* **8**, e78405–e78405 (2013).
34. Zheng, X. *et al.* Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *J. Neuroimmunol.* **194**, 107–114 (2008).

35. Driss, V. *et al.* The schistosome glutathione S-transferase P28GST, a unique helminth protein, prevents intestinal inflammation in experimental colitis through a Th2-type response with mucosal eosinophils. *Mucosal Immunol.* **9**, 322 (2015).
36. Schnoeller, C. *et al.* A Helminth Immunomodulator Reduces Allergic and Inflammatory Responses by Induction of IL-10-Producing Macrophages. *J. Immunol.* **180**, 4265 LP – 4272 (2008).
37. Ferreira, I. *et al.* Hookworm excretory/secretory products induce interleukin-4 (IL-4)+ IL-10+ CD4+ T cell responses and suppress pathology in a mouse model of colitis. *Infect. Immun.* **81**, 2104–2111 (2013).
38. Terrazas, C. A., Gómez-García, L. & Terrazas, L. I. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1051–1062 (2010).
39. Peón, A. N. *et al.* Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and Promoting a Suppressive Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2017**, 16 (2017).
40. Espinoza-Jiménez, A. F., De Har, R. & Terrazas, L. I. *Taenia crassiceps* antigens control experimental type I diabetes by inducing alternatively activated macrophages. *Mediators Inflamm.* **6**, 1–15 (2017).
41. Terrazas, C. A., Terrazas, L. I. & Gómez-García, L. Modulation of Dendritic Cell Responses by Parasites: A Common Strategy to Survive. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 357106 (2010).
42. Becerra-Díaz, M. & Terrazas, L. I. *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . *Int. J. Parasitol.* **44**, 613–23 (2014).
43. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Inmunología de Janeway.* (2009).
44. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
45. Gause, W. C., Wynn, T. A. & Allen, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 607–614 (2013).
46. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, (2005).
47. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, (2008).
48. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 392–404 (2014).
49. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
50. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* **177**, 7303 LP – 7311 (2006).
51. Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J. Immunol.* **181**, 3733 LP – 3739 (2008).
52. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
53. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
54. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.

F1000Prime Rep. **6**, 13 (2014).

55. Saccani, A. *et al.* p50 Nuclear Factor- κ B Overexpression in Tumor-Associated Macrophages Inhibits M1 Inflammatory Responses and Antitumor Resistance. *Cancer Res.* **66**, 11432 LP – 11440 (2006).
56. Jablonski, K. A. *et al.* Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* **10**, e0145342 (2015).
57. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I. & Munder, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology* **5**, 532 (2014).
58. Villedor, A. F., Comalada, M., Xaus, J. & Celada, A. The Differential Time-course of Extracellular-regulated Kinase Activity Correlates with the Macrophage Response toward Proliferation or Activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 7403–7409 (2000).
59. Chen, F., Sun, S. C., Kuh, D. C., Gaydos, L. J. & Demers, L. M. Essential Role of NF- κ B Activation in Silica-Induced Inflammatory Mediator Production in Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 985–992 (1995).
60. Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705–4708 (1994).
61. Harrison, D. A. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
62. Au-Yeung, N., Mandhana, R. & Horvath, C. M. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAK-STAT* **2**, e23931–e23931 (2013).
63. Chistiakov, D. A., Myasoedova, V. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology* **223**, 101–111 (2018).
64. Krausgruber, T. *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* **12**, 231–238 (2011).
65. Takaoka, A. *et al.* Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243 (2005).
66. Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W. & Clarke, C. J. IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 383–94 (2008).
67. Villedor, A. F. *et al.* Selective Roles of MAPKs during the Macrophage Response to IFN- γ . *J. Immunol.* **180**, 4523 LP – 4529 (2008).
68. Fujioka, S. *et al.* NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7806–7819 (2004).
69. López-Peláez, M., Soria-Castro, I., Boscá, L., Fernández, M. & Alemany, S. Cot/tpl2 activity is required for TLR-induced activation of the Akt p70 S6k pathway in macrophages: Implications for NO synthase 2 expression. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1733–1741 (2011).
70. Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Song, C. H. & Krystal, G. LPS-Induced Upregulation of SHIP Is Essential for Endotoxin Tolerance. *Immunity* **21**, 227–239 (2004).
71. Geert, R. *et al.* Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 597–602 (2002).
72. Van Dyken, S. J. & Locksley, R. M. Interleukin-4- and Interleukin-13-Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 317–343 (2013).
73. Varin, A. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology* **214**, 630–641 (2009).

74. Bansal, V. & Ochoa, J. B. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **6**, 223–228 (2003).
75. Munder, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 638–651 (2009).
76. Takeda, K. *et al.* Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**, 627–630 (1996).
77. Satoh, T. *et al.* The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* **11**, 936–944 (2010).
78. El Chartouni, C., Schwarzfischer, L. & Rehli, M. Interleukin-4 induced interferon regulatory factor (Irf) 4 participates in the regulation of alternative macrophage priming. *Immunobiology* **215**, 821–825 (2010).
79. Martinez, F. O. Regulators of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1531–1534 (2011).
80. Polumuri, S. K., Toshchakov, V. Y. & Vogel, S. N. Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase in Transcriptional Regulation of TLR-Induced IL-12 and IL-10 by Fcγ Receptor Ligation in Murine Macrophages. *J. Immunol.* **179**, 236 LP – 246 (2007).
81. Covarrubias, A. J., Aksoylar, H. I. & Horng, T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Semin. Immunol.* **27**, 286–296 (2015).
82. Weisser, S. B. *et al.* Alternative activation of macrophages by IL-4 requires SHIP degradation. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1742–1753 (2011).
83. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79 (1998).
84. Chawla, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ. Res.* **106**, 1559–1569 (2010).
85. Nagy, Z. S., Czimmerer, Z., Szanto, A. & Nagy, L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPARγ mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. *Immunobiology* **218**, 1336–44 (2013).
86. Liao, X. *et al.* Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **121**, 2736–2749 (2011).
87. Mahabeleshwar, G. H. *et al.* The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock. *Immunity* **34**, 715–728 (2011).
88. Park-Min, K.-H., Antoniv, T. T. & Ivashkiv, L. B. Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology* **210**, 77–86 (2005).
89. Baltimore, D., Boldin, M. P., O’Connell, R. M., Rao, D. S. & Taganov, K. D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* **9**, 839 (2008).
90. Self-Fordham, J., Naqvi, A., Uttamani, J., Kulkarni, V. & Nares, S. MicroRNA: Dynamic Regulators of Macrophage Polarization and Plasticity. *Front. Immunol.* **8**, 1062 (2017).
91. Zhou, H. *et al.* Identification of the microRNA networks contributing to macrophage differentiation and function. *Oncotarget; Vol 7, No 20* (2016).
92. Gurtan, A. M. & Sharp, P. A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J. Mol. Biol.* **425**, 3582–600 (2013).
93. Bhaskaran, M. & Mohan, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet. Pathol.* **51**, 759–774 (2014).
94. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1712 (2016).

95. Saini, H. K., Griffiths-Jones, S. & Enright, A. J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, (2007).
96. Sand, M. The Pathway of miRNA Maturation. in *miRNA Maturation SE - 1* (ed. Arenz, C.) **1095**, 3–10 (Humana Press, 2014).
97. Xie, M. & Steitz, J. A. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. *RNA Biol.* **11**, 673–681 (2014).
98. Zamudio, J. R., Kelly, T. J. & Sharp, P. A. Argonaute-bound small RNAs from promoter-proximal RNA polymerase II. *Cell* **156**, 920–934 (2014).
99. Graves, P. & Zeng, Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **10**, 239–45 (2012).
100. Meijer, H. A., Smith, E. M. & Bushell, M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1135 LP – 1140 (2014).
101. Eulalio, A. *et al.* Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* **15**, 21–32 (2009).
102. Zhang, X. & Zeng, Y. Regulation of Mammalian microRNA Expression. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **3**, 197–203 (2010).
103. Chipman, L. B. & Pasquinelli, A. E. miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet.* **35**, 215–222 (2019).
104. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**, 3–14 (2015).
105. Westholm, J. O. & Lai, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **93**, 1897–1904 (2011).
106. Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. & Mattaj, I. W. PHAX, a Mediator of U snRNA Nuclear Export Whose Activity Is Regulated by Phosphorylation. *Cell* **101**, 187–198 (2000).
107. Buck, A. H. *et al.* Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun* **5**, (2014).
108. Coakley, G., Buck, A. H. & Maizels, R. M. Host parasite communications — Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **208**, 33–40 (2016).
109. Bogerd, H. P. *et al.* A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs. *Mol. Cell* **37**, 135–142 (2010).
110. Zheng, Y. *et al.* Effects of *Echinococcus multilocularis* miR-71 mimics on murine macrophage RAW264.7 cells. *International Immunopharmacology* **34**, (2016).
111. Camargo, F. D. *et al.* Regulation of Progenitor Cell Proliferation and Granulocyte Function by microRNA-223. *Blood* **110**, 507 LP – 507 (2007).
112. O’Connell, R. M. *et al.* Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.* **205**, 585 LP – 594 (2008).
113. Mayoral, R. J. *et al.* MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells. *J. Immunol.* **182**, 433–445 (2009).
114. Koralov, S. B. *et al.* Dicer Ablation Affects Antibody Diversity and Cell Survival in the B Lymphocyte Lineage. *Cell* **132**, 860–874 (2008).
115. Malumbres, R. *et al.* Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **113**, 3754–3764 (2009).
116. Klein, U. *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* **17**, 28–40 (2010).

117. Thai, T.-H. *et al.* Regulation of the Germinal Center Response by MicroRNA-155. *Science* (80-.). **316**, 604 LP – 608 (2007).
118. Vigorito, E. *et al.* microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* **27**, 847–859 (2007).
119. Neilson, J. R., Zheng, G. X. Y., Burge, C. B. & Sharp, P. A. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev.* **21**, 578–589 (2007).
120. Cobb, B. S. *et al.* T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J. Exp. Med.* **201**, 1367–1373
121. Muljo, S. A. *et al.* Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J. Exp. Med.* **202**, 261 LP – 269 (2005).
122. Hashimi, S. T. *et al.* MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood* **114**, (2009).
123. Martinez-Nunez, R. T., Louafi, F., Friedmann, P. S. & Sanchez-Elsner, T. MicroRNA-155 Modulates the Pathogen Binding Ability of Dendritic Cells (DCs) by Down-regulation of DC-specific Intercellular Adhesion Molecule-3 Grabbing Non-integrin (DC-SIGN). *J. Biol. Chem.* **284**, 16334–16342 (2009).
124. Rodriguez, A. *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* **316**, 608–611 (2007).
125. Long, H. *et al.* Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett.* **428**, 90–103 (2018).
126. Tan, W. *et al.* MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncol. Lett.* **15**, 2735–2742 (2018).
127. Moschos, S. A. *et al.* Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics* **8**, 240 (2007).
128. Jennewein, C., von Knethen, A., Schmid, T. & Brüne, B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *J. Biol. Chem.* **285**, 11846–11853 (2010).
129. Kutty, R. K. *et al.* Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ . *Mol. Vis.* **19**, 737–750 (2013).
130. Fujita, S. *et al.* miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *J. Mol. Biol.* **378**, 492–504 (2008).
131. O’Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, (2007).
132. Qiagen. *miRNeasy Mini Handbook*. (2013).
133. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12481–12486 (2006).
134. Sheedy, F. J. *et al.* Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* **11**, (2010).
135. Androulidaki, A. *et al.* The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* **31**, 220–231 (2009).
136. Zhou, R. *et al.* NF-kappaB p65-Dependent Transactivation of miRNA Genes following *Cryptosporidium parvum* Infection Stimulates Epithelial Cell Immune Responses. *PLoS Pathog* **5**, e1000681 (2009).

137. Cameron, J. E. *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J. Virol.* **82**, 1946–1958 (2008).
138. Gatto, G. *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6608–6619 (2008).
139. Perry, M. M. *et al.* Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol.* **180**, 5689–5698 (2008).
140. Ma, X., Becker Buscaglia, L. E., Barker, J. R. & Li, Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 159–166 (2011).
141. Zhong, Y. & Yi, C. MicroRNA-720 suppresses M2 macrophage polarization by targeting GATA3. *Biosci. Rep.* **36**, e00363 (2016).
142. Ma, S. *et al.* A double feedback loop mediated by microRNA-23a/27a/24-2 regulates M1 versus M2 macrophage polarization and thus regulates cancer progression. *Oncotarget* **7**, 13502–13519 (2015).
143. O’Connell, R. M., Chaudhuri, A. A., Rao, D. S. & Baltimore, D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7113 LP – 7118 (2009).
144. Cremer, T. J. *et al.* MiR-155 induction by *F. novicida* but not the virulent *F. tularensis* results in SHIP down-regulation and enhanced pro-inflammatory cytokine response. *PLoS One* **4**, e8508–e8508 (2009).
145. Sun, Y. *et al.* miR-155 mediates suppressive effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. *Immunol. Lett.* **146**, 25–30 (2012).
146. Tili, E. *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* **179**, 5082–5089 (2007).
147. Zhang, Y., Zhang, M., Zhong, M., Suo, Q. & Lv, K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 797–802 (2013).
148. Cobos Jiménez, V. *et al.* Next-generation sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages. *Physiol. Genomics* **46**, 91–103 (2013).
149. Asirvatham, A. J., Magner, W. J. & Tomasi, T. B. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* **45**, 58–69 (2009).
150. Xia, Z. *et al.* MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 3425–3435 (2010).
151. Chen, Y. *et al.* HCV-Induced miR-21 Contributes to Evasion of Host Immune System by Targeting MyD88 and IRAK1. *PLOS Pathog.* **9**, e1003248 (2013).
152. Curtale, G. *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 11499–11504 (2013).
153. Hou, J. *et al.* MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.* **183**, 2150 LP – 2158 (2009).
154. Kondo, T., Kawai, T. & Akira, S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* **33**, 449–458 (2012).
155. Lai, L. *et al.* MicroRNA-92a negatively regulates Toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase. *J. Biol. Chem.* **288**, 7956–7967 (2013).
156. Li, S., Yue, Y., Xu, W. & Xiong, S. MicroRNA-146a Represses Mycobacteria-Induced Inflammatory Response and Facilitates Bacterial Replication via Targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PLoS One* **8**, e81438 (2013).
157. O’Neill, L. A., Sheedy, F. J. & McCoy, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev.*

Immunol. **11**, 163 (2011).

158. Witwer, K. W., Sisk, J. M., Gama, L. & Clements, J. E. MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J. Immunol.* **184**, 2369–2376 (2010).
159. Karo-Atar, D., Itan, M., Pasmanik-Chor, M. & Munitz, A. MicroRNA profiling reveals opposing expression patterns for miR-511 in alternatively and classically activated macrophages. *J Asthma* **52**, (2015).
160. Ponomarev, E. D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A. M. & Weiner, H. L. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nat. Med.* **17**, 64–70 (2011).
161. Veremeyko, T., Siddiqui, S., Sotnikov, I., Yung, A. & Ponomarev, E. D. IL-4/IL-13-Dependent and Independent Expression of miR-124 and Its Contribution to M2 Phenotype of Monocytic Cells in Normal Conditions and during Allergic Inflammation. *PLoS One* **8**, e81774 (2013).
162. Rossato, M. *et al.* IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3101–E3110 (2012).
163. Garg, M., Potter, J. A. & Abrahams, V. M. Identification of microRNAs that regulate TLR2-mediated trophoblast apoptosis and inhibition of IL-6 mRNA. *PLoS One* **8**, e77249–e77249 (2013).
164. Ma, F. *et al.* The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat. Immunol.* **12**, 861 (2011).
165. Xu, Z. *et al.* miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **286**, 21401–21412 (2011).
166. Qi, J. *et al.* microRNA-210 negatively regulates LPS-induced production of proinflammatory cytokines by targeting NF- κ B1 in murine macrophages. *FEBS Lett.* **586**, 1201–1207 (2012).
167. Chen, Q. *et al.* Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 β production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS One* **7**, e42971–e42971 (2012).
168. Kim, S. W. *et al.* MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci US A* **109**, (2012).
169. Ma, F. *et al.* MicroRNA-466l Upregulates IL-10 Expression in TLR-Triggered Macrophages by Antagonizing RNA-Binding Protein Tristetraprolin-Mediated IL-10 mRNA Degradation. *J. Immunol.* **184**, 6053 LP – 6059 (2010).
170. McCoy, C. E. *et al.* IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **285**, 20492–20498 (2010).
171. Czimmerer, Z. *et al.* The IL-4/STAT6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human and mouse macrophages regulating cell survival via miR-342-3p. *Genome Med.* **8**, 63 (2016).
172. R ckerl, D. *et al.* Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Blood* **120**, 2307–2316 (2012).
173. Guo, X. & Zheng, Y. MicroRNA expression profile in RAW264.7 macrophage cells exposed to *Echinococcus multilocularis* metacystodes. *Parasitology* **25**, 1–8 (2017).
174. Liu, G. & Abraham, E. MicroRNAs in Immune Response and Macrophage Polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 170–177 (2013).
175. He, M., Xu, Z., Ding, T., Kuang, D.-M. & Zheng, L. MicroRNA-155 Regulates Inflammatory Cytokine Production in Tumor-associated Macrophages via Targeting C/EBP β . *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 343–352 (2009).
176. Bala, S. *et al.* Up-regulation of MicroRNA-155 in Macrophages Contributes to Increased Tumor Necrosis Factor

- α (TNF α) Production via Increased mRNA Half-life in Alcoholic Liver Disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 1436–1444 (2011).
177. Zanoni, I., Ostuni, R. & Granucci, F. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages (BM-MFs). (2009).
 178. Su, S. & Liu, J. Isolation of mouse bone marrow-derived monocytes. *Protoc. Exch.* (2015).
 179. Weischenfeldt, J. & Porse, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *Cold Spring Harb. Lab. Protoc.* **3**, (2008).
 180. Peprotech. ELISA: Sandwich ABTS Protocol. <https://www.peprotech.com/en/support-protocols-eli> (2018).
 181. Green, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138 (1982).
 182. NanoString Technologies, I. nCounter® Data Analysis Guidelines for miRNA. 16 (2010).
 183. NanoString Technologies, I. *nCounter: Expression Data Analysis Guide.* (2012).
 184. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **43**, 460–466 (2015).
 185. Salmanidis, M., Pillman, K., Goodall, G. & Bracken, C. Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **54**, 304–11 (2014).
 186. Jin, X., Guo, X., Zhu, D., Ayaz, M. & Zheng, Y. miRNA profiling in the mice in response to *Echinococcus multilocularis* infection. *Acta Trop.* **166**, 39–44 (2017).
 187. Banerjee, S. *et al.* miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation. *J. Biol. Chem.* **288**, 35428–35436 (2013).
 188. Yongping, L. *et al.* microRNA-762 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by targeting IRF7 expression. *Cell Prolif.* **48**, 643–649 (2015).
 189. Dirgahayu, P., Fukumoto, S., Miura, K. & Hirai, K. Excretory/secretory products from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei* suppress the TNF- α gene expression by reducing phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK in macrophages. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1155–1162 (2002).
 190. Chen, L., Rao, K. V. N., He, Y.-X. & Ramaswamy, K. Skin-stage Schistosomula of *Schistosoma mansoni* Produce an Apoptosis-inducing Factor That Can Cause Apoptosis of T Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 34329–34335 (2002).
 191. Ramaswamy, K. *et al.* Secretion of an anti-inflammatory, immunomodulatory factor by Schistosomulae of *Schistosoma mansoni*. *J. Inflamm.* **46**, 13–22 (1995).
 192. Goodridge, H. S. *et al.* Modulation of Macrophage Cytokine Production by ES-62, a Secreted Product of the Filarial Nematode *Acanthocheilonema viteae*. *J. Immunol.* **167**, 940–945 (2001).
 193. Bai, X. *et al.* Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro. *Mol. Cell. Biochem.* **360**, 79–88 (2012).
 194. Chauhan, A. *et al.* Helminth Induced Suppression of Macrophage Activation Is Correlated with Inhibition of Calcium Channel Activity. *PLoS One* **9**, e101023 (2014).
 195. Donnelly, S. *et al.* Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB J.* **22**, 4022–4032 (2008).
 196. Hamilton, C. M. *et al.* The *Fasciola hepatica* Tegumental Antigen Suppresses Dendritic Cell Maturation and Function. *Infect. Immun.* **77**, 2488–2498 (2009).
 197. Almeida, S., Nejsum, P. & Williams, A. R. Modulation of human macrophage activity by *Ascaris* antigens is

- dependent on macrophage polarization state. *Immunobiology* **223**, 405–412 (2018).
198. Zawistowska-Deniziak, A., Basała, K., Strojny, B. & Młocicki, D. New Data on Human Macrophages Polarization by *Hymenolepis diminuta* Tapeworm—An In Vitro Study. *Frontiers in Immunology* **8**, 148 (2017).
 199. Billeter, A. T. *et al.* MicroRNA-155 potentiates the inflammatory response in hypothermia by suppressing IL-10 production. *FASEB J.* **28**, 5322–5336 (2014).
 200. Chen, T. *et al.* MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. *Cardiovasc. Res.* **83**, 131–139 (2009).
 201. Melton, D. W., Lei, X., Gelfond, J. A. L. & Shireman, P. K. Dynamic macrophage polarization-specific miRNA patterns reveal increased soluble VEGF receptor 1 by miR-125a-5p inhibition. *Physiol. Genomics* **48**, 345–360 (2016).
 202. Kolb, H. & Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol. Today* **13**, 157–160 (1992).
 203. Cabral, G. R. de A., Wang, Z. T., Sibley, L. D. & DaMatta, R. A. Inhibition of Nitric Oxide Production in Activated Macrophages Caused by *Toxoplasma gondii* Infection Occurs by Distinct Mechanisms in Different Mouse Macrophage Cell Lines. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1936 (2018).
 204. Hunter, C. A. & Sibley, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 766–778 (2012).
 205. Hakimi, M.-A., Olias, P. & Sibley, L. D. *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 615–645 (2017).
 206. Barteneva, N. S., Maltsev, N. & Vorobjev, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 49 (2013).
 207. White, R. R. & Artavanis-Tsakonas, K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence* **3**, 668–677 (2012).
 208. Adams, P. N., Aldridge, A., Vukman, K. V., Donnelly, S. & O'Neill, S. M. *Fasciola hepatica* tegumental antigens indirectly induce an M2 macrophage-like phenotype in vivo. *Parasite Immunol.* **36**, 531–539 (2014).
 209. Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F. & Voehringer, D. Alternatively activated macrophages inhibit T cell proliferation by STAT6-dependent expression of PD-L2. *Blood* **116**, 3311–3320 (2010).
 210. Fallon, P. G. *et al.* IL-4 Induces Characteristic Th2 Responses Even in the Combined Absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* **17**, 7–17 (2002).
 211. Yoshimoto, T. The Hunt for the Source of Primary Interleukin-4: How We Discovered That Natural Killer T Cells and Basophils Determine T Helper Type 2 Cell Differentiation In Vivo. *Front. Immunol.* **9**, 716 (2018).
 212. Ng Yan Hing, J. D., Desjardins, M. & Descoteaux, A. Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 810–816 (2004).
 213. Martinez, F. O. *et al.* Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: Similarities and differences. *Blood* **121**, (2013).
 214. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, (2010).
 215. Luo, C., Chen, M., Madden, A. & Xu, H. Expression of Complement Components and Regulators by Different Subtypes of Bone Marrow-Derived Macrophages. *Inflammation* **35**, 1448–1461 (2012).
 216. Naito, A. T. *et al.* Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* **149**, 1298–1313 (2012).

217. Cai, Y., Teo, B. H. D., Yeo, J. G. & Lu, J. C1q protein binds to the apoptotic nucleolus and causes C1 protease degradation of nucleolar proteins. *J. Biol. Chem.* **290**, 22570–22580 (2015).
218. Kerr, F. K. *et al.* Elucidation of the Substrate Specificity of the C1s Protease of the Classical Complement Pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 39510–39514 (2005).
219. Eriksson, H. & Nissen, M. H. Proteolysis of the heavy chain of major histocompatibility complex class I antigens by complement component C1s. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1037**, 209–215 (1990).
220. Busby, W. H. *et al.* The Complement Component C1s Is the Protease That Accounts for Cleavage of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5 in Fibroblast Medium. *J. Biol. Chem.* **275**, 37638–37644 (2000).
221. Bouchonnet, F., Boechat, N., Bonay, M. & Hance, A. J. α /Beta Interferon Impairs the Ability of Human Macrophages To Control Growth of Mycobacterium bovis BCG. *Infect. Immun.* **70**, 3020 LP – 3025 (2002).
222. Kumagai, Y. *et al.* Alveolar Macrophages Are the Primary Interferon- α Producer in Pulmonary Infection with RNA Viruses. *Immunity* **27**, 240–252 (2007).
223. Brook, M. *et al.* Neutrophil-derived alpha defensins control inflammation by inhibiting macrophage mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4350–4355 (2016).
224. Wehkamp, J., Schmid, M. & Stange, E. F. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **23**, (2007).
225. Reyes, J. L., González, M. I., Ledesma-Soto, Y., Satoskar, A. R. & Terrazas, L. I. TLR2 Mediates Immunity to Experimental Cysticercosis. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 1323–1333 (2011).
226. Bartel, D. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
227. Perry, C. G. R., Heigenhauser, G. J. F., Bonen, A. & Spriet, L. L. High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **33**, 1112–1123 (2008).
228. Perske, C. *et al.* Loss of inducible nitric oxide synthase expression in the mouse renal cell carcinoma cell line RENCA is mediated by microRNA miR-146a. *Am. J. Pathol.* **177**, 2046–2054 (2010).
229. Naqvi, A. R. *et al.* Expression Profiling of LPS Responsive miRNA in Primary Human Macrophages. *J. Microb. Biochem. Technol.* **8**, 136–143 (2016).
230. Jablonski, K. A., Gaudet, A. D., Amici, S. A., Popovich, P. G. & Guerau-de-Arellano, M. Control of the Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. *PLoS One* **11**, e0159724 (2016).
231. Chen, X.-M., Splinter, P. L., O’Hara, S. P. & LaRusso, N. F. A Cellular Micro-RNA, let-7i, Regulates Toll-like Receptor 4 Expression and Contributes to Cholangiocyte Immune Responses against Cryptosporidium parvum Infection. *J. Biol. Chem.* **282**, 28929–28938 (2007).
232. Murphy, A. J., Guyre, P. M. & Pioli, P. A. Estradiol suppresses NF- κ B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. *J. Immunol.* **184**, 5029–5037 (2010).
233. Jingjing, Z. *et al.* MicroRNA-24 Modulates Staphylococcus aureus-Induced Macrophage Polarization by Suppressing CHI3L1. *Inflammation* **40**, 995–1005 (2017).
234. Han, H. *et al.* MicroRNA expression profile in different tissues of BALB/c mice in the early phase of Schistosoma japonicum infection. *Mol. Biochem. Parasitol.* **188**, 1–9 (2013).
235. Terrazas, C. A., Alcántara-Hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. I. & Satoskar, A. R. Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB J.* **27**, 4547–4560 (2013).
236. Hou, R. *et al.* miR-762 can negatively regulate menin in ovarian cancer. *Oncotargets. Ther.* **10**, 2127–2137

(2017).

237. Karali, M. *et al.* miRNeYE: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* **11**, 715 (2010).
238. Shi, Y. *et al.* Histone deacetylase inhibitors alter the expression of molecular markers in breast cancer cells via microRNAs. *Int. J. Mol. Med.* **42**, 435–442 (2018).
239. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**, (2006).
240. Mun, J. *et al.* MicroRNA-762 Is Upregulated in Human Corneal Epithelial Cells in Response to Tear Fluid and *Pseudomonas aeruginosa* Antigens and Negatively Regulates the Expression of Host Defense Genes Encoding RNase7 and ST2. *PLoS One* **8**, e57850 (2013).
241. Sansoni, V. *et al.* Effects of repeated sprints training on fracture risk-associated miRNA. *Oncotarget* **9**, 18029–18040 (2018).
242. Seclaman, E. *et al.* MicroRNA Expression in Laser Micro-dissected Breast Cancer Tissue Samples – a Pilot Study. *Pathol. Oncol. Res.* (2017). doi:10.1007/s12253-017-0343-y
243. Hu, Y. *et al.* miR-484 suppresses proliferation and epithelial–mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* **17**, 36 (2017).
244. Pashaei, E., Pashaei, E., Ahmady, M., Ozen, M. & Aydin, N. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One* **12**, e0179543 (2017).
245. Zearo, S. *et al.* MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer* **14**, 200 (2014).
246. Yi, R. *et al.* miR-484/MAP2/c-Myc-positive regulatory loop in glioma promotes tumor-initiating properties through ERK1/2 signaling. *J. Mol. Histol.* **40**, 209–218 (2018).
247. Tang, B. *et al.* Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *FEBS Lett.* **584**, 1481–1486 (2010).
248. Rajaram, M. V. S. *et al.* Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17408–17413 (2011).
249. Cunha, C., Gomes, C., Vaz, A. R. & Brites, D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators Inflamm.* **2016**, 6986175 (2016).
250. Imaizumi, T. *et al.* *IFN-γ* and *TNF-α* synergistically induce microRNA-155 which regulates *TAB2/IP-10* expression in human mesangial cells. *American journal of nephrology* **32**, (2010).
251. Li, X. *et al.* miR-155 acts as an anti-inflammatory factor in atherosclerosis-associated foam cell formation by repressing calcium-regulated heat stable protein 1. *Sci. Rep.* **6**, 21789 (2016).
252. Mo, Z.-X. *et al.* Infection by the nematode *Angiostrongylus cantonensis* induces differential expression of miRNAs in mouse brain. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **51**, 94–102 (2018).

10. ANEXOS

10.1 ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN DERIVADO DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO

Referencia completa:

Diana Martínez-Saucedo, Juan de Dios Ruíz-Rosado, César Terrazas, et al., “*Taenia crassiceps*-Excreted/Secreted Products Induce a Defined MicroRNA Profile that Modulates Inflammatory Properties of Macrophages,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2019, Article ID 2946713, 24 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2946713>.

Research Article

***Taenia crassiceps*-Excreted/Secreted Products Induce a Defined MicroRNA Profile that Modulates Inflammatory Properties of Macrophages**

Diana Martínez-Saucedo,^{1,2} Juan de Dios Ruíz-Rosado,² César Terrazas,³ Blanca E. Callejas,¹ Abhay R. Satoskar,³ Santiago Partida-Sánchez,² and Luis I. Terrazas^{1,4}

¹Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico

²Center for Microbial Pathogenesis, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA

³Department of Pathology, The Ohio State University, Columbus, OH, USA

⁴Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Luis I. Terrazas; literrazas@unam.mx

Received 10 January 2019; Accepted 26 March 2019; Published 14 May 2019

Guest Editor: Hadi M. Yassine

Copyright © 2019 Diana Martínez-Saucedo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Helminth parasites modulate immune responses in their host to prevent their elimination and to establish chronic infections. Our previous studies indicate that *Taenia crassiceps*-excreted/secreted antigens (TcES) downregulate inflammatory responses in rodent models of autoimmune diseases, by promoting the generation of alternatively activated-like macrophages (M2) *in vivo*. However, the molecular mechanisms triggered by TcES that modulate macrophage polarization and inflammatory response remain unclear. Here, we found that, while TcES reduced the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, and TNF α), they increased the release of IL-10 in LPS-induced bone marrow-derived macrophages (BMDM). However, TcES alone or in combination with LPS or IL-4 failed to increase the production of the canonical M1 or M2 markers in BMDM. To further define the anti-inflammatory effect of TcES in the response of LPS-stimulated macrophages, we performed transcriptomic array analyses of mRNA and microRNA to evaluate their levels. Although the addition of TcES to LPS-stimulated BMDM induced modest changes in the inflammatory mRNA profile, it induced the production of mRNAs associated with the activation of different receptors, phagocytosis, and M2-like phenotype. Moreover, we found that TcES induced upregulation of specific microRNAs, including miR-125a-5p, miR-762, and miR-484, which are predicted to target canonical inflammatory molecules and pathways in LPS-induced BMDM. These results suggest that TcES can modulate proinflammatory responses in macrophages by inducing regulatory posttranscriptional mechanisms and hence reduce detrimental outcomes in hosts running with inflammatory diseases.

1. Introduction

Helminth infections induce polarized T_H2-type biased immune responses that play a role in parasite expulsion, tissue repair, and regulation of unrelated inflammatory and autoimmune responses in the host [1–3]. The striking ability of helminth parasites in conferring protection from diseases of immune dysregulation has increased the attention into

the immunomodulatory mechanisms evoked by these pathogens. Previous studies in our laboratory, using a murine model of cysticercosis, demonstrated that chronic infection with the helminth *Taenia crassiceps* or administration of its excreted/secreted products (TcES) ameliorates the development of experimental ulcerative colitis, autoimmune encephalomyelitis (EAE), and type 1 diabetes [4–8]. The ability of *T. crassiceps* and TcES to counteract these inflammatory

responses was demonstrated to be dependent on a population of macrophages that produced markers of alternative activation (M2), such as PD-L2, IL-4R α , MR, IL-10, ARG1, YM1, and FIZZ1 [9].

Macrophages can be activated towards an M2 phenotype after being stimulated with IL-4 produced by T_H2 lymphocytes during parasitic infections or exposure to allergens [10, 11]. In contrast, released IFN- γ and pathogen or danger-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs) during infections or tissue injury, respectively, promote classical (M1) activation in macrophages [1, 12]. Although a crucial role for *T. crassiceps*-induced M2 macrophages in regulating detrimental autoimmune and inflammatory responses has been demonstrated [3], the transcriptional events elicited by TcES that modulate macrophage activation have not been elucidated.

Helminth infections and/or their antigens can trigger the levels of microRNAs to modulate inflammatory responses in the host [13–15]. MicroRNAs are small non-coding RNAs that regulate cell functions posttranscriptionally through direct binding to the 3'-UTR (untranslated region) of target messenger RNAs (mRNAs), resulting in the destabilization of mRNAs and repression of translation [16]. Recently, microRNAs have been associated with helminth-induced M2 macrophages *in vitro* and *in vivo*. For instance, R ckerl et al. reported that macrophages obtained during acute (3 weeks) *Brugia malayi* infection induced microRNAs associated with M2 macrophages, such as miR-199-5p, miR-378-3p, and miR-125b-5p [15]. In addition, Guo and Zheng identified distinct microRNAs, including miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-21a-5p, miR-146b-5p, miR-99b-3p, miR-125a-5p, and miR-378, in RAW 264.7 macrophages cocultured with metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. In these studies, the authors suggested a role for these microRNAs in targeting important inflammatory mRNAs (*Tnf*, *Il1a*, *Il6*, *Il12a*, *Il12b*, *Ccl22*, and *Ccl18* mRNA) [14]. Thus, microRNAs may be a key mechanism elicited by helminths in the regulation of inflammatory responses in the host.

Although we have previously demonstrated a role for the TcES in preventing STAT1 phosphorylation in inflammatory macrophages [17], the influence of TcES in macrophage polarization and the transcriptional pathways regulating this process remain unknown. Here, we determined the effect of TcES alone or in combination with LPS or IL-4, in the regulation of multiple mRNA transcripts and microRNAs induced in macrophages. Our results indicate that TcES decreased the production of inflammatory cytokines (IL-12, TNF α , and IL-6) in LPS-induced macrophages but has a limited role in inducing directly the production of M1- and/or M2-associated molecules. The immune-modulatory ability of TcES was further associated with increased levels of specific microRNAs, which are predicted to target, according to our bioinformatic analysis, numerous inflammatory mRNAs involved in the TNF and NF- κ B signaling pathways. These findings suggest a role for TcES in modulating the transcriptional profile of macrophages via altering their microRNA profile and, consequently, the inflammatory properties of these immune cells.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement. All experiments in this study were performed according to the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the US National Institutes of Health. The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the Research Institute at Nationwide Children's Hospital and the Ohio State University approved all protocols.

2.2. Mice. Adult 6- to 8-week female BALB/c mice were purchased from The Jackson Laboratory. All animals were maintained in a pathogen-free environment and established as breeding colonies in the Transgenic Mouse Facility at the Research Institute at Nationwide Children's Hospital or in specific pathogen-free conditions at the Ohio State University Laboratory Animal Resources. The mice were housed in sterilized polycarbonate cages with basic filter top caging containing pine wood shavings and were offered mouse ration and water *ad libitum*. The cages were held in Isolation and Containment cubicles (Britz and Co., Wheatland, WY).

2.3. Parasites and TcES. Metacestodes of *T. crassiceps* (ORF strain) were harvested under sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 8-10 weeks of intraperitoneal (i.p.) infection. The cysticerci were washed four times in physiological saline solution prior to maintaining them in culture with a sterile saline solution at 37°C for 24 h. The supernatant was recovered and centrifuged for 10 min at 1000 g. The heavy fraction of TcES was concentrated using the 50 kDa Amicon Ultra Filter (Millipore), 30 min at 1000 g. Protease inhibitors were added to the >50 kDa fraction, and samples were stored at -70°C until further use.

2.4. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM). To generate bone marrow-derived macrophages (BMDM), we followed the protocol previously described [18]. Briefly, bone marrow cells were obtained by flushing femurs and tibias from BALB/c mice with a sterile saline solution. The isolated cells were plated in 100 mm Petri dishes at 1×10^6 cells/mL in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM, Mediatech, Herndon, VA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Grand Island, NY), 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, and 20 ng/mL of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, BioLegend). On day 7, the cells were harvested, washed, counted, and replated in culture media (without M-CSF) at a density of 2×10^6 cells/well (12-well plate, Falcon polystyrene). BMDM were incubated with either TcES (25 μ g/mL), *Escherichia coli* LPS (1 mg/mL, Sigma-Aldrich), interleukin-4 (20 ng/mL), TcES+LPS or TcES+IL-4. After 4 and 24 h poststimulation, BMDM were harvested for flow cytometric and transcriptomic analysis. The supernatants were recovered for cytokine detection by ELISA.

2.5. Flow Cytometric Analysis. Flow cytometric analysis was performed as previously described [19]. Briefly, harvested

BMDM were incubated in 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-mouse Fc receptor antibody in 100 mL PBS containing 0.5% BSA plus 0.02% NaN_3 (FACS buffer) for 15 min on ice. Subsequently, single-cell suspensions were stained for 15 min at 4°C with blue-fluorescent reactive dye, L23105 (Life Technologies) to discriminate dead cells. After washing, $1-3 \times 10^6$ cells were surface-stained in FACS buffer for 15 min at 4°C with antibodies recognizing CD11b (Alexa Fluor 700, BioLegend), F4/80 (Brilliant Violet 785, BioLegend), CD86 (Brilliant Violet 421, BioLegend), PD-L1 (PE-Cy7, BioLegend), and PD-L2 (PE, BioLegend). Surface-stained cells were washed three times with FACS buffer and treated with Fix/Perm reagent according to the protocol of the cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The cells were intracellularly stained in FACS buffer containing anti-Nos2 (PE, eBiosciences) and anti-h/m arginase 1 (APC, R&D systems) for 30 min at 4°C and further collected on an LSR II cytofluorometer (BD, Franklin Lakes, NJ). Stained cells were gated according to size (SSC-A) and forward scatter (FSC-A) to eliminate debris. Doublets were excluded from the analysis by using forward scatter height (FSC-H) and FSC-A. Data analysis was performed using FlowJo Software (FlowJo, LLC).

2.6. Cytokine Assay. Supernatants from cell cultures of stimulated macrophages were recovered at 4 and 24 h poststimulation, and the levels of the cytokines IL-10, IL-6, TNF α , and IL-12 were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (PeproTech).

2.7. RNA Extraction and Arrays. Total RNA was extracted from BMDM stimulated with LPS (M_{LPS}), TcES (M_{TcES}), LPS+TcES ($M_{\text{TcES+LPS}}$), or culture media (M_0) using QIAzol reagent (QIAGEN), according to the manufacturer's specifications, and stored at -80°C. Next, RNA was purified following the miRNeasy kit protocol (QIAGEN). RNA concentration and integrity were determined using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) and Agilent Bioanalyzer 2100, respectively. For transcriptomic analysis, 50 ng/ μL of RNA was used for the nCounter Inflammation Panel (NanoString mRNAs) and the nCounter miRNA Assay set (microRNAs). Both mRNA and microRNA arrays were performed following the manufacturer's instructions at the Genomics Shared Resource, OSU. Data analysis for the nCounter Inflammatory Panel (mRNA) and for the nCounter miRNA Assay set was conducted using the nSolver™ Analysis Software according to the manufacturer. For the nCounter Inflammatory Panel (mRNA), we normalized using the normalization factor and subtracted the background (mean of negative controls ± 2 standard deviations). Next, we normalized using the geometric mean of housekeeping genes as reported [20]. Then, using the normalized counts, we calculated the fold change (FC) by comparing M_{TcES} , $M_{\text{TcES+LPS}}$, and M_{LPS} to M_0 . For the nCounter miRNA Assay set, we first normalized using the normalization factor. The background was subtracted from the data using the mean of negative controls ± 2 standard deviations. Finally, we used the top 75 microRNAs [21]. The normalized counts were used to

calculate the FC by comparing M_{TcES} , $M_{\text{TcES+LPS}}$, and M_{LPS} to M_0 . Of the 566 total probes measured in the assay, 183 and 236 microRNAs for 4 h and 24 h, respectively, were identified and used for analyzing significant changes in microRNA levels among samples. MultiExperiment Viewer (MeV) was used to generate heat maps, which represent \log_2 -transformed data.

2.8. Real-Time PCR. TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) were used to quantify and/or validate the levels of mRNAs and microRNA transcripts. cDNA was generated from mRNAs, using a 15 μL RT reaction consisting of 2.0 μL of Buffer (10x), 0.8 μL 100 mM dNTPs (100 mM), 1.0 μL reverse transcriptase, 2.0 μL of mRNA primer, and 1 μg of total RNA. RT reaction was incubated for 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, and 5 min at 85°C. For microRNA levels, a 15 μL reaction was prepared with 2.0 μL of buffer (10x), 0.2 μL 100 mM dNTPs (100 mM), 1.0 μL reverse transcriptase, 0.2 μL RNase inhibitor (20 U/ μL), 3.0 μL of microRNA primer, and 100 ng of total RNA. RT reaction was incubated as mentioned before. For both mRNA and microRNAs, quadruplicate real-time PCR reactions were performed in the 7500 Real-Time PCR system. The amplification reaction mix was composed of 10 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), 1 μL of the specific mRNA or microRNA probe, and 1 μL of specific microRNA cDNA. The reactions were preincubated for 10 minutes at 95°C and amplified with 40 cycles consisting of 10 sec at 95°C, 40 sec at 60°C, and 5 sec at 72°C (fluorescence acquisition). To assess possible bias for reference RNA, we used 18S RNA, *Actb*, and *Gapdh* mRNAs. Relative quantification was calculated by $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. All mRNA and microRNA assays were tested for reproducibility and linearity (PCR efficiency was between 1.9 and 2.0 for all assays). All primers were purchased from Applied Biosystems. The primer sequences are shown in Table S1.

2.9. mRNA and MicroRNA Target Gene Prediction and Bioinformatics Analysis. Target mRNAs of differentially produced microRNAs were predicted using DIANA-TarBase database v6.0, which includes experimentally validated targets from the literature. To explore the potential biological function of the microRNAs' profile and their targets, DIANA-mirPath v2.0 (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>) was used to perform enrichment analysis of microRNA's target mRNAs in the KEGG pathway and in GO terms [22].

2.10. Statistical Analysis. Data analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. Statistical comparisons were performed by using Student's *t*-test. *p* values less than 0.05 were considered significant. Graphed data are presented as mean \pm SD or SEM.

3. Results

3.1. TcES Reduces the Inflammatory Response of LPS-Induced BMDM. Previously, we demonstrated the ability of TcES in reducing the development of inflammatory and autoimmune diseases in rodent models [4–8]. The effect of TcES in

counteracting detrimental inflammatory responses *in vivo* is associated with the emergence of polarized macrophages towards an M2 phenotype [4, 5, 11]. Although studies in our laboratory indicate a role for TcES in blocking the IFN- γ /STAT1 signaling pathway in macrophages [17], the effect of TcES in inducing directly M2 macrophages remains to be elucidated. To define the macrophage profile elicited by TcES, we first determined the levels of the inflammatory cytokines IL-12, IL-6, TNF α , and IL-10 in cultures from BMDM. The cells were stimulated (Figure 1(a)) for 4 h or 24 h with TcES (henceforth M_{TcES}), *E. coli* lipopolysaccharide (M_{LPS}), interleukin-4 (M_{IL-4}), TcES+LPS ($M_{TcES+LPS}$), TcES+IL-4 ($M_{TcES+IL-4}$), or PBS (M_0). Supernatants obtained from M_{TcES} displayed higher levels of IL-10 and deficient levels of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF α) compared to all the groups at 4 h poststimulus (Figures 1(b) and 1(e)). However, IL-10 production by M_{TcES} did not continue at 24 h. Interestingly, we found that exposure of macrophages to TcES and stimulated with LPS ($M_{TcES+LPS}$) significantly reduced the production of IL-12, IL-6, and TNF α compared to those in M_{LPS} at 24 h (Figures 1(c) and 1(e)). Increased IL-10 levels were observed in supernatants from $M_{TcES+LPS}$ compared with all groups at 24 h (Figure 1(b)). A similar trend was identified in the levels of the mRNA for *Tnf* at 24 h poststimulus (Figure 1(f)), whereas levels of *Il10* mRNA were similar between all groups at 24 h (Figure 1(g)). Our results suggest that TcES play a role in downregulating the production of proinflammatory cytokines in LPS-induced BMDM, by increasing the production of a regulatory cytokine.

To gain insight in the phenotypic profile induced by TcES in macrophages, we used flow cytometry technique to determine the production of intracellular nitric oxide synthase (NOS2), and arginase-1 (ARG1), as the conventional markers for M1 and M2 profiles, respectively, in BMDM. Our results showed that while M_{LPS} and M_{IL-4} presented increased percentages of NOS2⁺ and ARG1⁺ macrophages, respectively, M_{TcES} displayed limited production of these molecules (Figures 2(a) and 2(d)). Additionally, similar percentages of NOS2⁺ BMDM were found between $M_{TcES+LPS}$ and M_{LPS} , and comparable ARG1⁺ BMDM were observed when analyzing $M_{TcES+IL-4}$ versus M_{IL-4} (Figures 2(a) and 2(d)). Levels of mRNA *Arg1* by RT-qPCR showed similar trends as the flow cytometric analysis (Figure 2(f)). While the levels of *Nos2* mRNA were upregulated in $M_{TcES+LPS}$ compared to M_0 but significantly reduced compared to M_{LPS} (Figure 2(e)). These data suggest that the stimulus with TcES, either alone or in combination with LPS or IL-4, has a limited role in inducing the production of canonical M1 or M2 markers. Nevertheless, these antigens play a role in downregulating the proinflammatory response to LPS in BMDM.

3.2. TcES Modify the Proinflammatory mRNA Profile of LPS-Induced BMDM. Because our data suggest a novel role for TcES in attenuating the proinflammatory response of LPS-induced BMDM, and the current M1/M2 paradigm scarcely describes the influence of TcES in the transcriptional profile of macrophages, we performed a proinflammatory mRNA

array screen (see “mRNA array” for details) on M_0 , M_{LPS} , M_{TcES} , and $M_{TcES+LPS}$, at 4 and 24 h poststimulus (Figure 3). Commonly produced mRNAs among the groups of M_{LPS} , M_{TcES} , and $M_{TcES+LPS}$ are displayed in Table S2. As expected, our results indicate increased levels of multiple proinflammatory mRNAs in M_{LPS} with respect to M_0 (Table 1 and Table S3), including *Il1a*, *Il6*, *Il12a*, *Il12b*, *Tnf*, and *Nos2*, among other mRNAs, at 4 and 24 h poststimulus. These molecules correspond to previously reported markers for LPS-stimulated macrophages [1]. In contrast, M_{TcES} downregulated the levels, with respect to M_0 , of cytokines, chemokines, and transcriptional factors distinctive of M1-activated macrophages, while displaying upregulated levels mainly associated with enzymes, as MAPK pathway, at 4 and 24 h poststimulus (Table 1 and Table S4). Noticeably, although $M_{TcES+LPS}$ presented 132 and 96 upregulated mRNAs (Table S5), these macrophages only shared 6 and 3 upregulated mRNAs with M_{TcES} at 4 and 24 h poststimulus, respectively. However, $M_{TcES+LPS}$ shared 89 and 65 upregulated mRNAs with M_{LPS} at 4 and 24 h poststimulus, respectively, including transcripts for cytokines, chemokines, receptors, and transcriptional factors as *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il12a*, *Il12b*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccl2*, *Ccl7*, *Cd86*, *Tlr2*, *Stat1*, *Stat3*, and *Nfkb1* mRNA. The differentially induced mRNAs between $M_{TcES+LPS}$ and M_{LPS} are shown in Table S6. Next, we validated 7 mRNAs associated with M1 (*Il1b*, *Stat1*, *Cd86*, *Il6*, and *Il12b*) and M2 (*Stat6* and *Chi3l3*) macrophages by RT-qPCR. The levels of these mRNAs were comparable to those observed in the mRNA array (Figure 4), which attest for the high quality of our array, supporting that a posttranscriptional mechanism induced by TcES may have a role in macrophage’s response to LPS. Interestingly, although the levels of IL-6 and IL-12 in supernatants from $M_{TcES+LPS}$ were significantly reduced respect to M_{LPS} (Figures 1(a) and 1(b)), the levels of their mRNAs of these cytokines were comparable between $M_{TcES+LPS}$ and M_{LPS} . These data suggest that posttranscriptional mechanisms triggered by TcES may have a role in modulating the production of specific inflammatory cytokines.

3.3. TcES Modulate the Profile of MicroRNAs in LPS-Stimulated BMDM. MicroRNAs participate in diverse biological processes at the posttranscriptional regulatory level. The complementary binding of microRNAs to mRNAs reduces either transcription or translation of mRNA transcripts [16]. Recently, a handful of studies indicate a role for helminth parasites and their antigens in inducing microRNAs to modulate host immune responses [14, 15, 23]. To determine whether the ability of TcES in attenuating the inflammatory response of BMDM is associated with the production of specific microRNAs, we performed a microRNA array (see “microRNA array” in Materials and Methods for details) in M_0 , M_{LPS} , M_{TcES} , and $M_{TcES+LPS}$, at 4 and 24 h poststimulus. As a result, we identified 7 and 89 upregulated microRNAs in M_{LPS} at 4 h and 24 h, respectively. M_{TcES} displayed 13 (4 h) and 3 (24 h), and $M_{TcES+LPS}$ showed 19 (4 h) and 28 (24 h) upregulated microRNAs (Figure 5). The top 10 up- and downregulated microRNAs in M_{LPS} , M_{TcES} , and

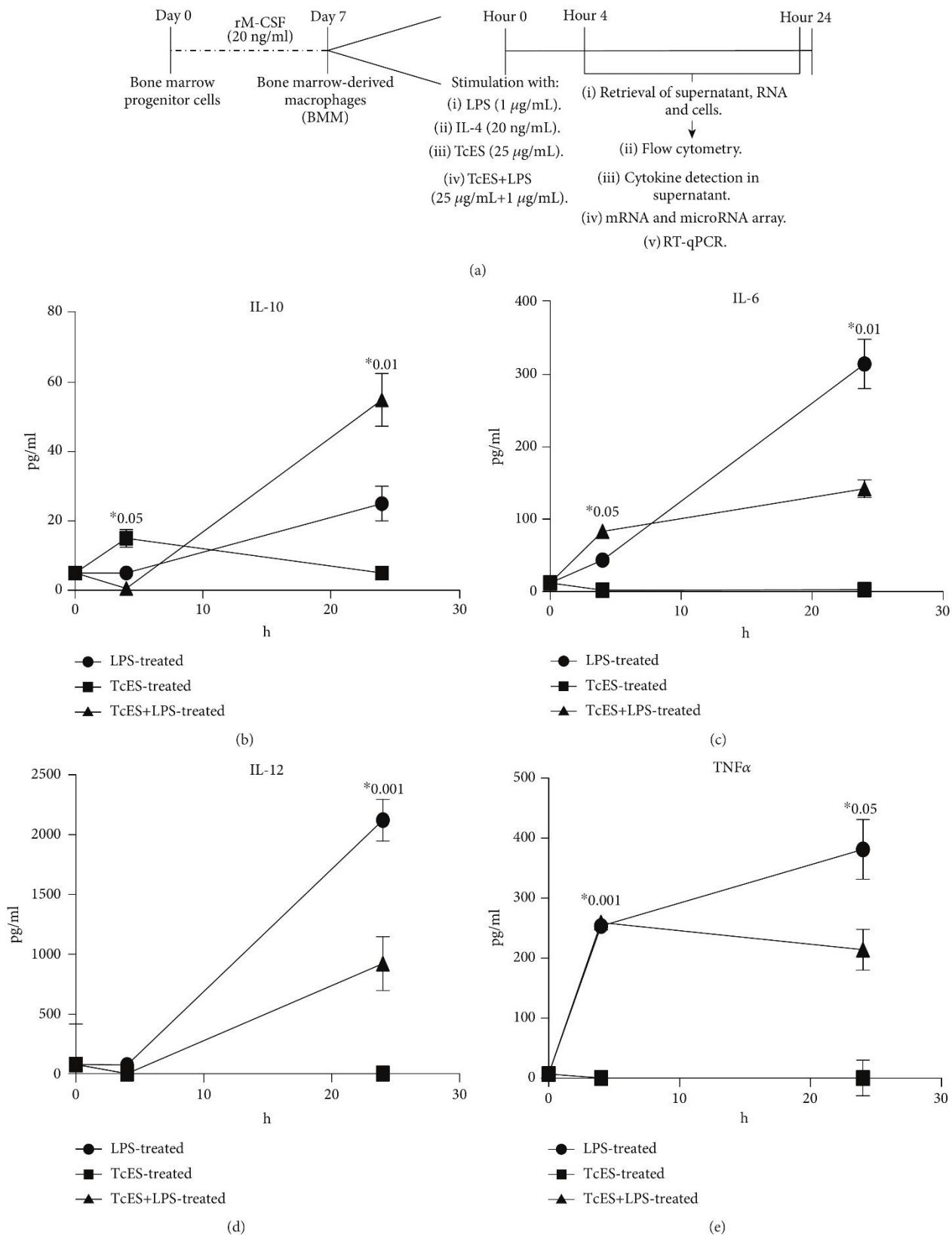


FIGURE 1: Continued.

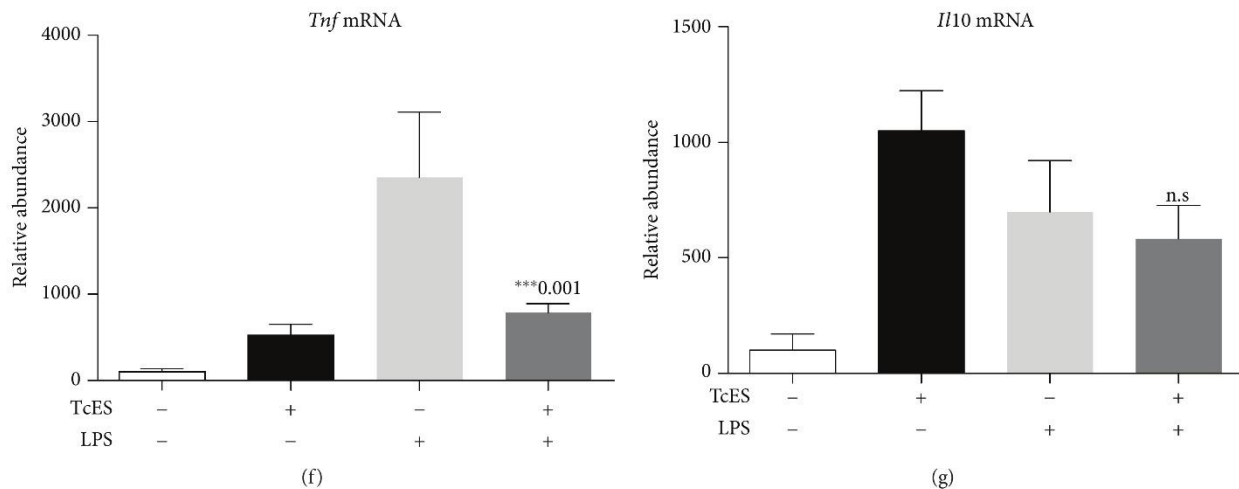


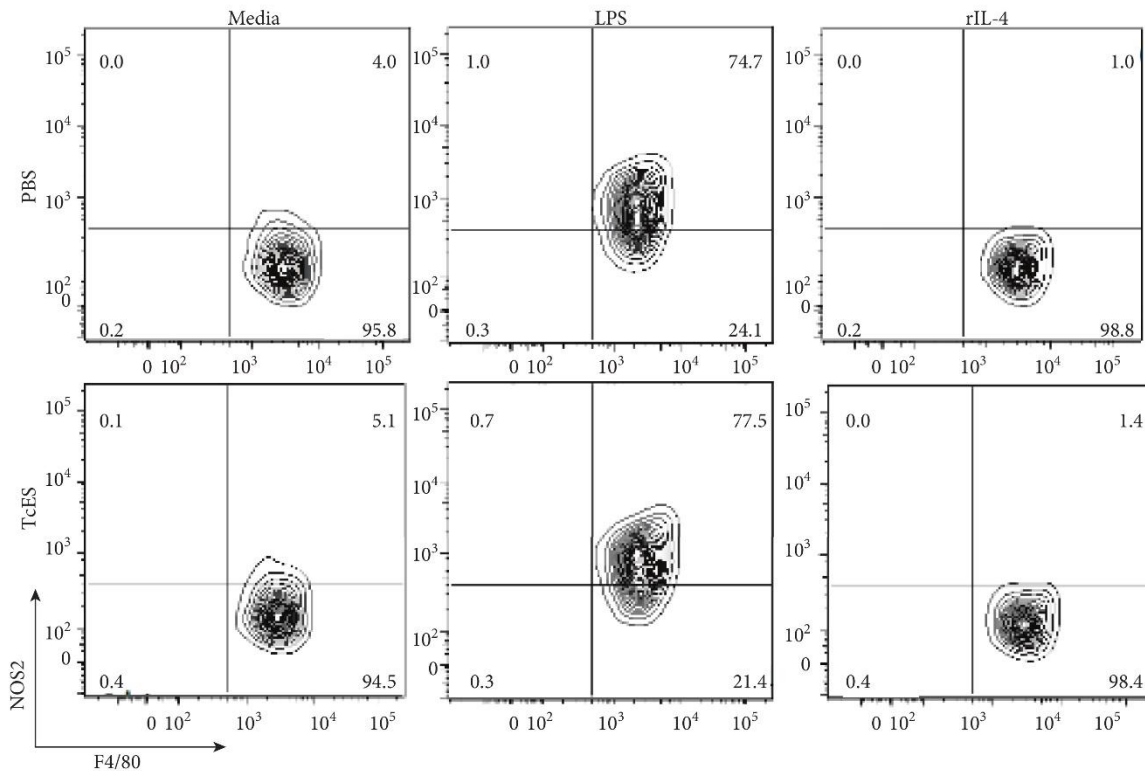
FIGURE 1: TcES regulates the production of inflammatory cytokines in LPS-induced macrophages. (a) Flow diagram of general experimental design. For differentiation of macrophages, bone marrow progenitor cells were cultured with rM-CSF at 37°C 5% CO₂ for 7 days. On completion day, BMDM were washed and stimulated with the following stimuli: LPS (1 μg/mL), TcES (25 ng/mL), or both for 4 or 24 hours. The supernatants, total RNA or cells were harvested for later procedures. (b) Kinetics levels of IL-10, (c) IL-6, (d) IL-12, and (e) TNFα in supernatants from stimulated BMDM. Evaluation of the levels of (f) *Tnf* and (g) *Il10* mRNA by RT-qPCR in groups of stimulated macrophages mentioned above ($n = 6$, 3 replicates condition). mRNA levels are represented as mean relative (\pm SD). Data are representative of 3 independent experiments using 3 replicates per stimuli. Significance was calculated using *t*-test. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$.

$M_{TcES+LPS}$ are shown in Table 2. The complete lists of microRNAs are shown in Table S7–S9. Additionally, we found 4 and 2 microRNAs shared among the groups of stimulated BMDM at 4 and 24 h, respectively (Table S10). Interestingly, $M_{TcES+LPS}$ shared 6 upregulated microRNAs with M_{TcES} and only 3 with M_{LPS} at 4 h poststimulus. However, $M_{TcES+LPS}$ did not share microRNAs with M_{TcES} and shared 22 with M_{LPS} at 24 h poststimulus. Finally, $M_{TcES+LPS}$ differentially induced 3 and 20 microRNAs compared to M_{LPS} at 4 and 24 h poststimulation, respectively (Table S11). These data suggest that TcES induce the early production (4 h) of microRNAs, followed by the stimulus with LPS (24 h), in $M_{TcES+LPS}$. This phenomenon is associated with an increased number of upregulated microRNAs in M_{TcES} compared to M_{LPS} (13 vs. 7 microRNAs, Figure 5) at 4 h poststimulation.

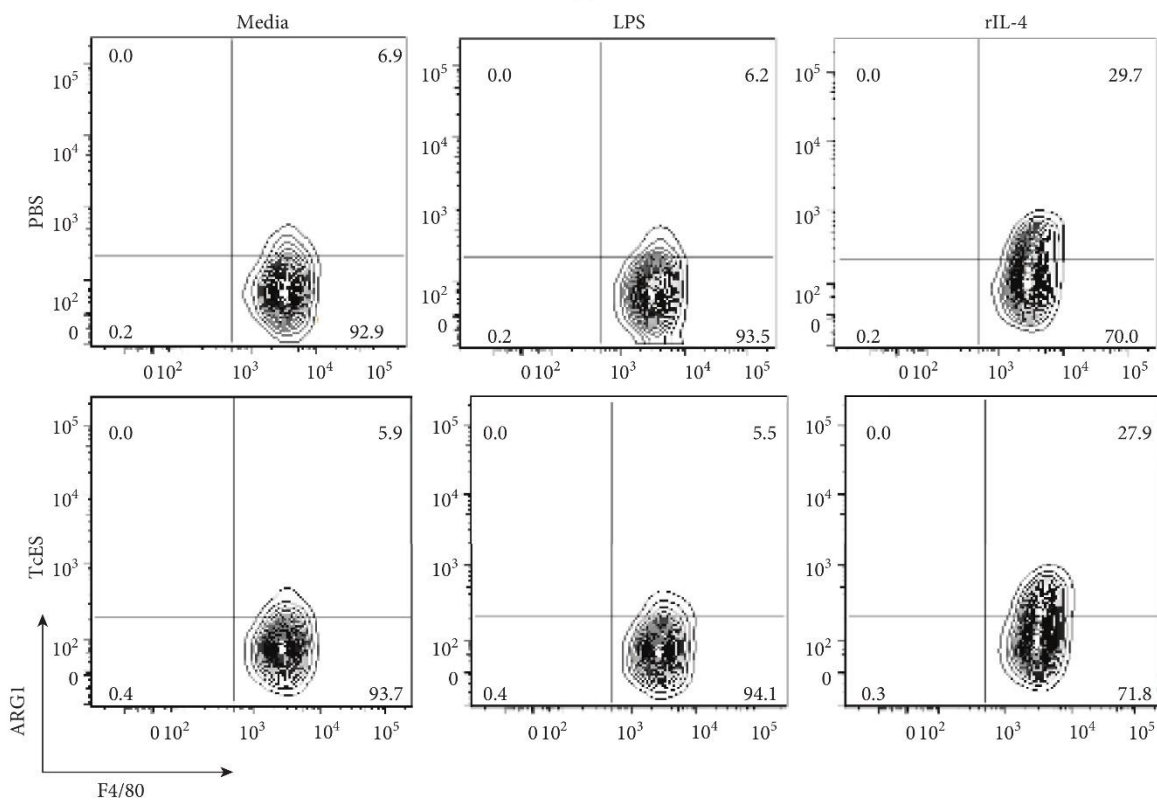
To assess the potential biological relevance of the upregulated microRNAs in the transcriptional profile of activated macrophages, we conducted bioinformatic analysis as GO terms and KEGG pathway analysis by comparing M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$, or M_{LPS} vs. M_0 at both 4 and 24 h poststimulus. The GO terms in M_{TcES} and $M_{TcES+LPS}$ were mainly enriched for the biological process associated with anatomical structure development, cell differentiation, and cellular protein differentiation process at 4 h poststimulus (Figures 6(a) and 6(b)). Anatomical structure development, cell differentiation, and chromosome organization were predicted to be a target by microRNAs in M_{TcES} , while organelle, anatomical structure, and cell differentiation were enriched in $M_{TcES+LPS}$ at 24 h poststimulus (Figures 6(d) and 6(e)). Lastly, GO terms enriched for M_{LPS} are chromosome organization, biosynthetic process, and protein complex as well as organelle,

anatomical structure, and cell differentiation at 4 and 24 h poststimulus, respectively (Figures 6(c) and 6(f)). The KEGG pathway enrichment analysis revealed that at 4 h stimulus, upregulated microRNAs were regulating glioma, chronic myeloid leukemia, and TGF-β signaling pathway in M_{TcES} (Figure 6(a)); ubiquitin-mediated proteolysis, p53, and GhRH signaling pathway in $M_{TcES+LPS}$ (Figure 6(b)); and prostate cancer, steroid biosynthesis, and FoxO signaling pathway in M_{LPS} (Figure 6(c)). In contrast, the KEGG enrichment pathways at 24 h poststimulus were axon guidance, insulin signaling pathway, and HTLV-I infection in $M_{TcES+LPS}$ (Figure 6(e)) and inositol phosphate metabolism, pathways in cancer, and insulin signaling pathway in M_{LPS} (Figure 6(f)). For more details of GO enrichment analysis and KEGG pathways, refer to Table S12 and Table S13. These data suggest a role for TcES in inducing microRNAs that regulate important metabolic, cell signaling, and inflammatory pathways in LPS-stimulated BMDM.

Next, we selected and validated by RT-qPCR four microRNAs (miR-125a-5p, miR-762, miR-155-5p, and miR-484), which are potentially involved in the regulation of inflammatory mRNAs, as indicated by previous studies and our bioinformatics analysis. We found that both M_{LPS} and M_{TcES} showed increased levels of miR-125a-5p (Figure 7(a)), a microRNA reported to reduce the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, and TNFα) [24]. The levels of miR-125a-5p were sustained in M_{LPS} and $M_{TcES+LPS}$ until 24 h poststimulus (Figure 7(b)). The combined stimuli of TcES and LPS induced an additive effect in the levels of this microRNA at 4 h poststimulation (Figure 7(a)). Furthermore, M_{TcES} and $M_{TcES+LPS}$ showed increased levels of miR-762, a microRNA known to directly target the mRNA of



(a)



(b)

FIGURE 2: Continued.

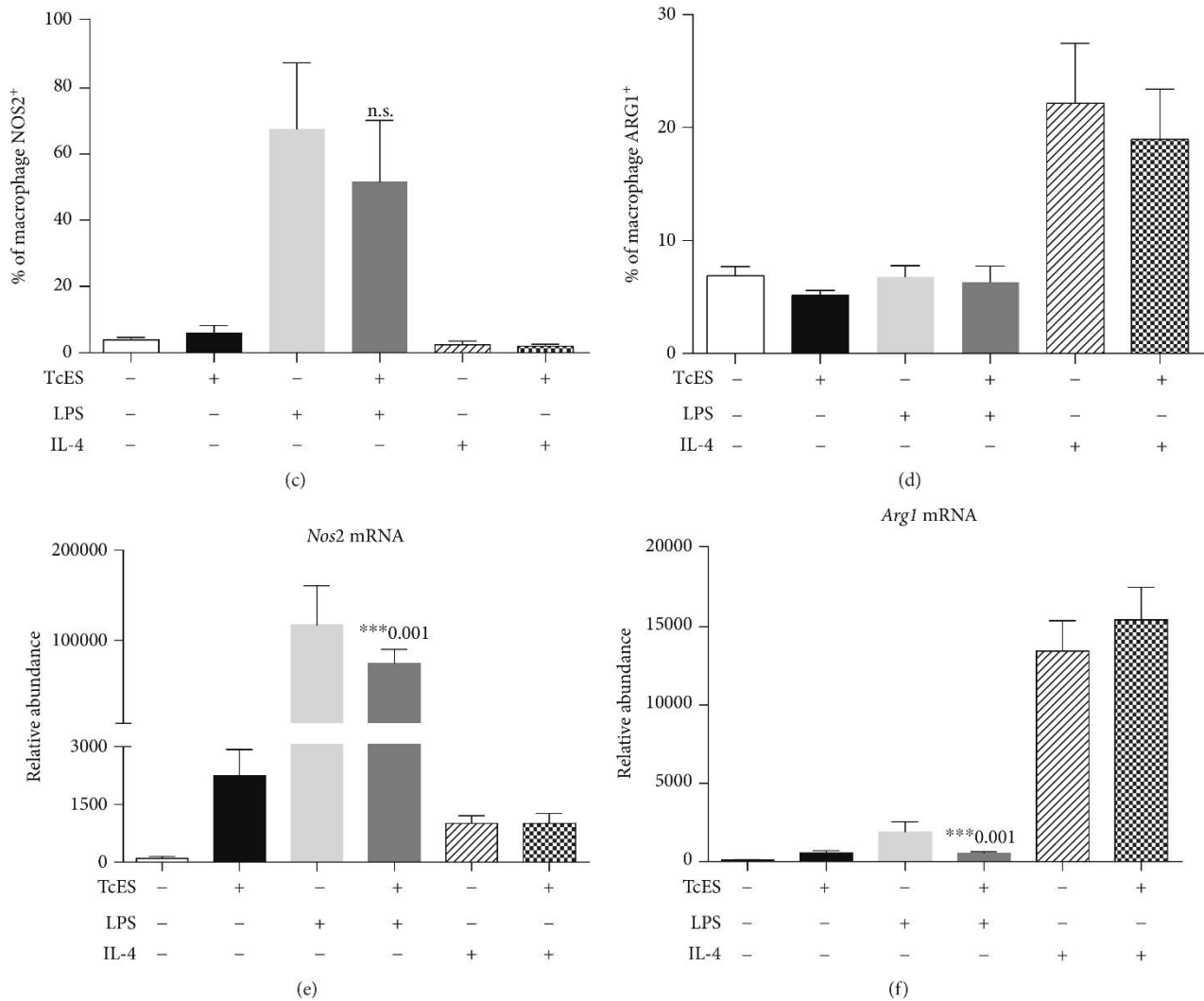


FIGURE 2: TcES do not modify the production of canonical M1/M2 macrophage markers. Representative dot plots, obtained by flow cytometry, of (a) F4/80⁺NOS2⁺ and (b) F4/80⁺ARG1⁺ BMDM, after 24 h poststimulus with one of the following stimuli: LPS (1 μ g/mL), TcES (25 ng/mL), IL-4 (20 ng/mL), TcES+LPS, TcES+IL-4, or PBS. Bar graphs representing the percentage of (c) F4/80⁺NOS2⁺ and (d) F4/80⁺ARG1⁺ BMDM at 24 h poststimulus. (e) Evaluation of the levels of *Nos2* and (f) *Arg1* mRNA by RT-qPCR in BMDM stimulated for 24 h ($n = 6$, 3 replicates condition). mRNA levels are represented as mean relative (\pm SD). Data are shown as a representative of two independent experiments. Significance was calculated using *t*-test. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$.

inflammatory transcription factor *Irf7* [25], at 4 h poststimulus (Figure 7(c)). This microRNA was later produced in M_{LPS} at 24 h poststimulation (Figure 7(d)). In addition, miR-484 was highly produced in M_{TcES} compared to both $M_{TcES+LPS}$ and M_{LPS} at 4 and 24 h poststimulus (Figures 7(e)–7(f)). Our bioinformatic analysis suggests that miR-484 can potentially target *Nfkb*, *Stat5a*, *Irf1*, *Myd88*, *Stat1*, and *Il12a* mRNAs. Finally, miR-155-5p, a well-defined microRNA in M1 macrophages, was upregulated in M_{LPS} and $M_{TcES+PS}$ compared to M_{TcES} at 4 and 24 h poststimulation (Figures 7(g)–7(h)). The profile of these miRNAs was comparable to those observed in the microRNA array. Altogether, our findings suggest a role for miR-125a-5p, miR-762, and miR-484 in the immunomodulatory effect of TcES in BMDM.

4. Discussion

Helminth parasites and their antigens can counteract pro-inflammatory responses generated during autoimmune diseases [3]. In our laboratory, we have previously demonstrated that infection with the helminth parasite *T. crassiceps* or the administration of TcES reduced the symptoms of EAE, type I diabetes, and ulcerative colitis, in part due to the polarization of macrophages *in vivo* towards an M2 phenotype [4–8, 26]. However, the functional role of TcES in regulating the activation and inflammatory response of macrophages remains unknown. In this study, we evaluated the effect of TcES on the polarization towards an M2 profile, inflammatory immune response, and transcriptional profile of macrophages *in vitro*.

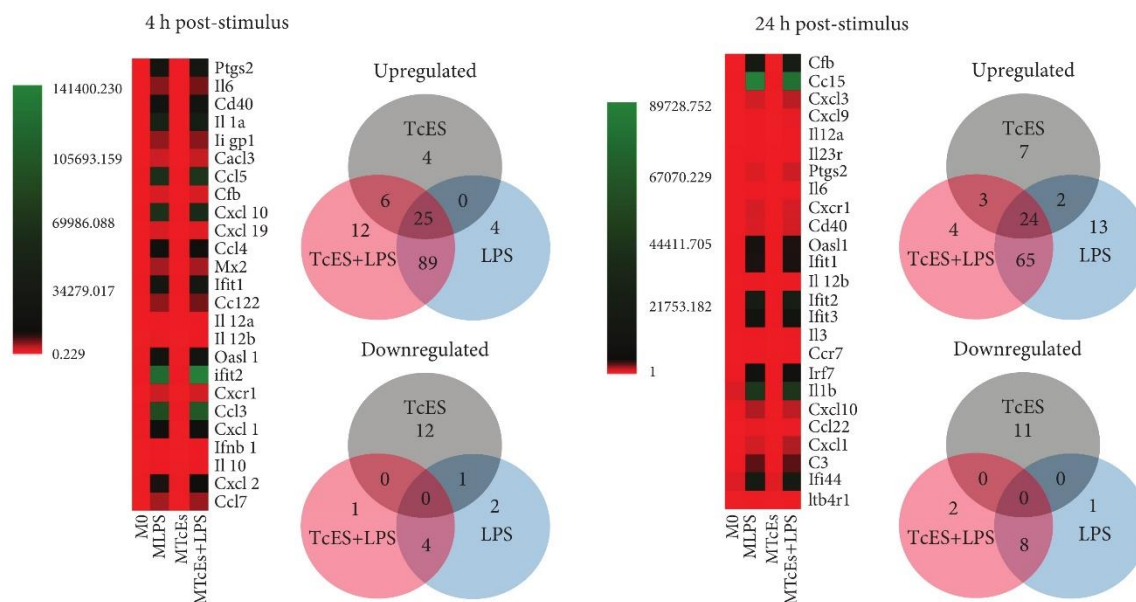


FIGURE 3: Top 25 upregulated mRNAs in stimulated BMDM. Heat maps show mRNA levels among M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$, and M_{LPS} at 4 and 24 h poststimulus. Each row represents mRNA levels, and each column represents a specific sample. The color scale illustrates the relative levels of mRNA: green, increased production; red, decreased production; and black, mean value. Venn diagrams show the unique and overlapping mRNA transcripts among the samples.

We first measure the production of the cytokines IL-6, IL-10, IL-12, and $TNF\alpha$ in BMDM-stimulated with TcES alone or in combination with LPS and observed that TcES increased the levels of the regulatory cytokine IL-10 and reduced the release of the inflammatory cytokines IL-6, IL-12, and $TNF\alpha$ in supernatants from LPS-stimulated BMDM. TcES alone did not increase the production of inflammatory cytokines but induced the release of IL-10 in BMDM. The levels of both mRNAs of *Il10* and *Tnf* measured by RT-qPCR showed similar trends when compared to the levels of cytokines obtained by ELISA assay, suggesting a consistent role for TcES in regulating cytokine production by inhibition of their transcripts.

Here, we evaluated the production of NOS2 and ARG1 in BMDM stimulated with TcES alone or in combination with IL-4 or LPS. M1 macrophages normally produce NOS2, which metabolizes L-arginine to nitric oxide (NO), while M2 macrophages produce ARG1, which metabolizes L-arginine to produce prolines and polyamines [2, 27]. We found that whereas BMDM stimulated with IL-4 or LPS alone showed increased levels of ARG1 and NOS2, respectively, TcES did not alter the production of both NOS2 and ARG1, after 24 h poststimulation. Our data are in agreement with previous studies using *Fasciola hepatica* tegumental antigens, which also failed to directly induce the production of molecules associated with M2 macrophages *in vitro* but not *in vivo* [28]. The production of M2 canonical molecules such as ARG1 has been reported to be IL-4-dependent, which is produced by T_H2 T cells, natural killer T cells, and basophils but not macrophages [29–31]. Therefore, helminth antigen stimulation alone is not enough to induce functional polarization of BMDM towards M2; however, they influence

the inflammatory properties of these cells. Therefore, TcES do not induce the production of M2-associated molecules but counteract inflammatory response in macrophages *in vitro*.

Recent studies indicate a regulatory role for helminth antigens obtained from *Trichinella spiralis*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Schistosoma mansoni*, and *Hymenolepis diminuta* in reducing cytokine production and subsequent inflammation [32–41]. However, the analysis of a small number of inflammatory products and/or conventional M1 and M2 markers poorly describes the effect of these antigens in the proinflammatory profile of macrophages. Therefore, using array approaches (nCounter Inflammation Panel, NanoString mRNAs), we determined the levels of multiple mRNAs involved in macrophage inflammatory response. As expected, M_{TcES} displayed a lower number of upregulated inflammatory mRNAs, when compared to M_{LPS} at 4 (42 vs. 120 mRNAs) and 24 h poststimulus (36 vs. 104 mRNAs). M_{TcES} induced mRNAs associated with phagocytosis, M2 macrophage, and anti-inflammatory response. For instance, M_{TcES} showed increased levels of *Pkca* mRNA necessary for the biogenesis of phagolysosomes [42]. In addition, M_{TcES} increased levels of *Irf3*, *C1s*, and *Ptgs* mRNAs which have been previously associated with anti-inflammatory microenvironments and identified in M2 macrophages [43–53]. Although our results suggest that TcES induce mRNAs associated with M2 macrophages, the stimulus with these helminth-derived molecules is not enough to induce a full expression of all M2 markers in macrophages as observed in previously reported studies [28].

In contrast, $M_{TcES+LPS}$ and M_{LPS} shared more than 60 proinflammatory mRNAs at both 4 and 24 h

TABLE 1: Top 10 of mRNA.

(a)

MTcES vs. M0		4 h poststimulus MTcES+LPS vs. M0		MLPS vs. M0	
Upregulated mRNAs	Downregulated mRNAs	Upregulated mRNAs	Downregulated mRNAs	Upregulated mRNAs	Downregulated mRNAs
FC	FC	FC	FC	FC	FC
Cytokines	Cytokines	Cytokines	Receptors	Cytokines	Cytokines
<i>Ifna1</i>	<i>Il12b</i>	<i>Il6</i>	<i>Ccr2</i>	<i>Il6</i>	<i>Ifna1</i>
2.8	0.2	5974.7	0.2	5140.9	0.2
Chemokines	<i>Il23a</i>	<i>Il1a</i>	<i>Cd163</i>	<i>Il1a</i>	Transcriptional factors
	0.2	3556.5	0.1	4198.0	
<i>Ccl21a</i>	<i>Il1b</i>	<i>Il12a</i>	<i>Ptger3</i>	<i>Il12a</i>	<i>Mef2c</i>
6.3	0.1	626.2	0.1	739.4	0.2
Transcriptional factors	Complement proteins	<i>Il12b</i>	<i>Ccr3</i>	<i>Il12b</i>	Receptors
		582.3	0.1	957.3	
<i>Irf3</i>	<i>C2</i>	Chemokines	Transcriptional factors	Chemokines	<i>Ptger3</i>
8.8	0.2				0.1
<i>Mafg</i>	Receptors	<i>Cxcl3</i>	<i>Mef2c</i>	<i>Cxcl3</i>	<i>Ccr2</i>
3.1		2527.8	0.2	2285.7	0.2
Complement proteins	<i>Cxcr1</i>	<i>Cxcl10</i>	Enzymes	<i>Cxcl10</i>	<i>Cd163</i>
	0.2	2060.0		2215.6	0.1
<i>C1s</i>	Transcriptional factors	<i>Cxcl9</i>	<i>Limk1</i>	<i>Cxcl9</i>	Enzymes
6.3		1285.0	0.4	1699.8	
Antiviral proteins	<i>Elk1</i>	<i>Ccl22</i>	Inflammatory-related proteins	<i>Ccl22</i>	<i>Plcb1</i>
	0.2	666.9		540.2	0.5
<i>Hspb1</i>	Inflammatory- related proteins	<i>Ptgs2</i>	<i>Oasl1</i>	Inflammatory-related proteins	<i>Ptgs1</i>
4.5		6106.5	570.6	5432.4	0.4
Enzymes	<i>Lta</i>	<i>Oasl1</i>		<i>Ptgs2</i>	<i>Limk1</i>
	0.2	570.6		504.8	0.3
<i>Defa-rs1</i>	Enzymes			<i>Oasl1</i>	
8.0					
<i>Prkca</i>	<i>Ftl1</i>				
8.0	0.2				
<i>Ptgs1</i>	<i>Plcb1</i>				
2.1	0.1				
Others	Others				
<i>Mbl2</i>	<i>Krg1</i>				
4.5	0.4				

FC: fold change.

(b)

		24 h poststimulus					
		MTcES vs. M0		MTcES+LPS vs. M0		MLPS vs. M0	
		Downregulated		Downregulated		Upregulated	
		mRNAs		mRNAs		mRNAs	
		FC	FC	FC	FC	FC	FC
Upregulated							
mRNAs							
Cytokines							
<i>Ifna1</i>		3.7	338.8	<i>Il12a</i>	0.2	<i>Il12a</i>	252.8
Chemokines				<i>Il6</i>	0.1	<i>Il6</i>	165.3
<i>Ccl21a</i>		6.4	194.2	<i>Ccr3</i>	0.1	Chemokines	0.0
Antiviral proteins				<i>Cd5</i>	0.2	<i>Cd5</i>	3007.4
<i>Hspb1</i>		4.8	2687.8	<i>Cxcl3</i>	0.0	<i>Cxcl3</i>	823.1
Enzymes				<i>Mrc1</i>	0.2	<i>Trem2</i>	0.2
<i>Alox5</i>		8.9	410.0	<i>Trem2</i>	0.2	<i>Ccr3</i>	0.4
<i>Plcb1</i>		5.2				Complement-related proteins	Enzymes
<i>Prkaa</i>		12.1		<i>Enzymes</i>		<i>Cfb</i>	17948.5
<i>Map2k6</i>		5.3		<i>Enzymes</i>		<i>Pigs1</i>	0.1
<i>Ppp1r12b</i>		4.0		<i>Enzymes</i>		Transcriptional factors	Transcriptional factors
<i>Defa-s1</i>		3.1		<i>Receptors</i>		<i>Cxcr1</i>	0.2
<i>Map3k9</i>		3.1		<i>Receptors</i>		<i>Il23r</i>	215.8
				<i>Receptors</i>		<i>Mef2c</i>	0.1
				<i>Complement-related proteins</i>		<i>Cd40</i>	0.4
				<i>Complement-related proteins</i>		Enzymes	
				<i>Inflammatory-related proteins</i>		<i>Pigs2</i>	144.5
				<i>Areg</i>	2.5		

FC: fold change.

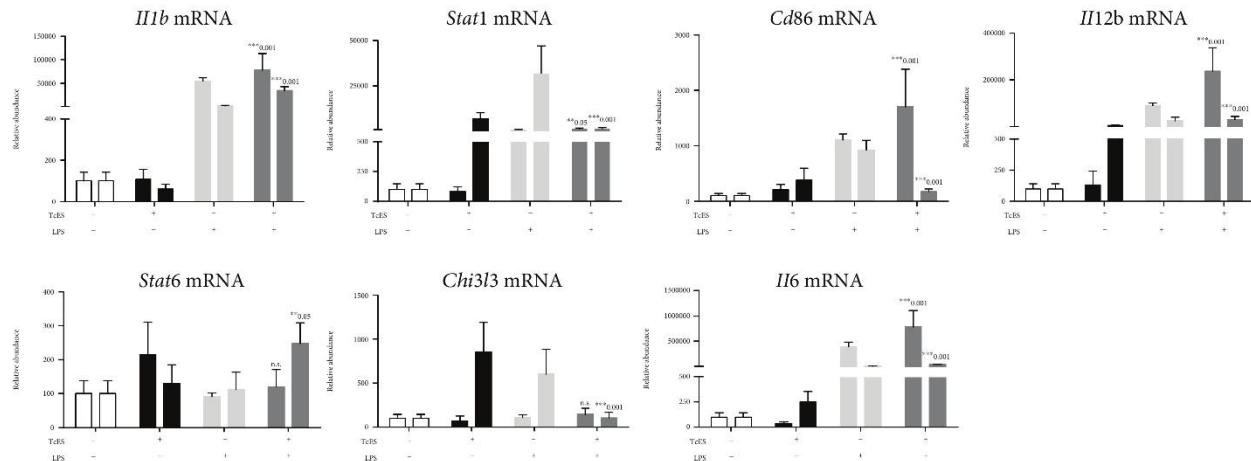


FIGURE 4: Validation and identification of mRNAs in stimulated BMDM. Macrophages were cultured in the presence of TcES (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or both TcES+LPS for 4 (left bar) and 24 h (right bar) poststimulation. Relative levels of selected mRNA were determined by TaqMan mRNA assays after normalization with 18S RNA. The levels of mRNA are represented as fold change relative to the PBS-treated group (FC \pm SD). Data shown are representative of two independent experiments ($n = 6$, 3 replicates condition). Significance was calculated using t -test. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$.

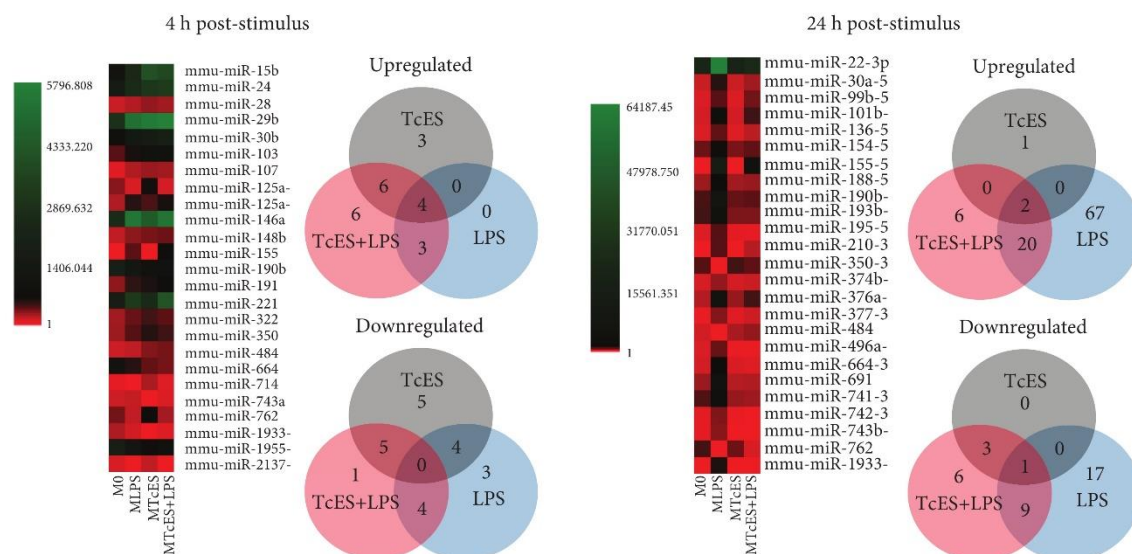


FIGURE 5: Differentially and commonly produced microRNAs in stimulated BMDM. The heat map shows the top 25 of microRNAs produced among M_{LPS} , M_{TcES} , and $M_{TcES+LPS}$ 4h and 24h poststimulus. Each row represents a microRNA, and each column represents a specific sample. The color scale illustrates the relative level of microRNAs: green, increased production; red, decreased production; and black, mean value. Venn diagram showing the unique and overlapping microRNAs. A total of 22 and 96 modified microRNAs were found at 4 and 24 h poststimulation.

poststimulation. Interestingly, we observed reduced levels of different inflammatory mRNAs, e.g., *Nox1*, *Ccl21a*, *Ccr4*, and *Cxcr2*, in $M_{TcES+LPS}$ with respect to M_{LPS} at 24h poststimulus. Noteworthy, although the levels of *Il6*, *Il12a*, and *Il12b* mRNAs were similar between $M_{TcES+LPS}$ and M_{LPS} , reduced levels of these cytokines were detected in supernatants from $M_{TcES+LPS}$ with respect to M_{LPS} . A similar phenomenon has been reported for *Acanthocheilonema viteae* antigens, in decreasing TNF α production in macrophages without altering *Tnf* transcripts [35], suggesting the participation of other

posttranscriptional mechanisms. Additionally, M_{TcES} and $M_{TcES+LPS}$ shared levels of the mRNAs for *Irf3*, *Defa1*, *C1s1*, and *Ifna1* at 4h, and *Hspb1*, *Maff*, and *Map2k6* at 24h post stimulus. While levels of *Irf3* and *C1s1* mRNAs suggest an M2-like profile, levels of *Ifna1* mRNA suggest that TcES could be recognized through TLR3, TLR7/8, or TLR9 [54, 55]. To note, *Defa1* mRNA codifies protein HNP1 (human neutrophil- α defensin), which inhibits macrophage-driven inflammation through targeting proinflammatory cytokines and NO [56, 57]. Lastly, we noted that *Thr2* mRNA was upregulated in $M_{TcES+LPS}$

TABLE 2: Top 10 of microRNAs.

(a)

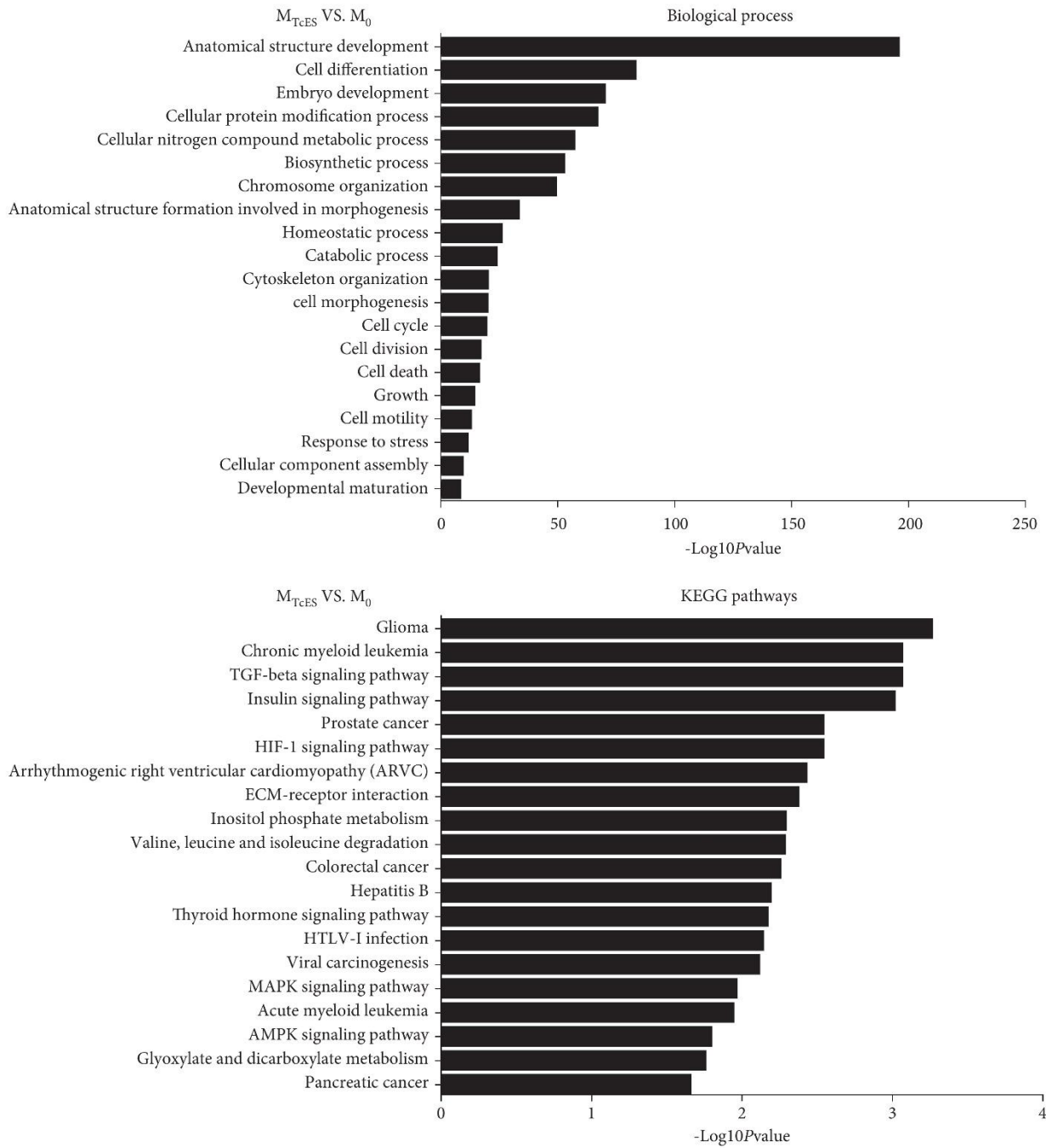
MTcES vs. M0				4 h poststimulus MTcES+LPS vs. M0				MLPS vs. M0			
Upregulated MicroRNA	FC	Downregulated MicroRNA	FC	Upregulated MicroRNA	FC	Downregulated MicroRNA	FC	Upregulated MicroRNA	FC	Downregulated MicroRNA	FC
mmu-miR-421-3p	102.60	mmu-miR-539-5p	0.02	mmu-miR-155-5p	676.18	mmu-miR-190b-5p	0.49	mmu-miR-155-5p	402.62	mmu-miR-125a-3p	0.33
mmu-miR-484	2.35	mmu-miR-467c-5p	0.02	mmu-miR-546	112.84	mmu-miR-1955-5p	0.47	mmu-miR-546	76.67	mmu-miR-1224-5p	0.31
mmu-miR-350-3p	2.22	mmu-miR-1193-3p	0.02	mmu-miR-128-3p	88.90	mmu-miR-1933-5p	0.41	mmu-miR-146a-5p	2.09	mmu-miR-467f	0.02
mmu-miR-148b-3p	2.14	mmu-miR-199a-3p	0.01	mmu-miR-421-3p	84.34	mmu-miR-125a-3p	0.36	mmu-miR-539-5p	0.02	mmu-miR-539-5p	0.02
mmu-miR-125a-3p	2.13	mmu-miR-383-5p	0.01	mmu-miR-331-3p	74.08	mmu-miR-664-3p	0.35	mmu-miR-380-3p	0.02	mmu-miR-380-3p	0.02
mmu-miR-191-5p	2.12	mmu-miR-489-3p	0.01	mmu-miR-484	2.62	mmu-miR-1224-5p	0.35	mmu-miR-467c-5p	0.02	mmu-miR-467c-5p	0.02
mmu-miR-30b-5p	2.09	mmu-miR-1953	0.01	mmu-miR-191-5p	2.46	mmu-miR-1193-3p	0.02	mmu-miR-714	0.02	mmu-miR-714	0.02
mmu-miR-103-3p	2.07	mmu-miR-743a-3p	0.01	mmu-miR-30b-5p	2.44	mmu-miR-2137	0.01	mmu-miR-489-3p	0.01	mmu-miR-489-3p	0.01
mmu-miR-29b-3p	1.99	mmu-miR-410-3p	0.01	mmu-miR-99b-5p	2.40	mmu-miR-210-3p	0.01	mmu-miR-2137	0.01	mmu-miR-2137	0.01
		mmu-miR-1933-5p	0.00	mmu-miR-148b-3p	2.32	mmu-miR-804	0.01	mmu-miR-804	0.01	mmu-miR-804	0.01

FC: fold change

(b)

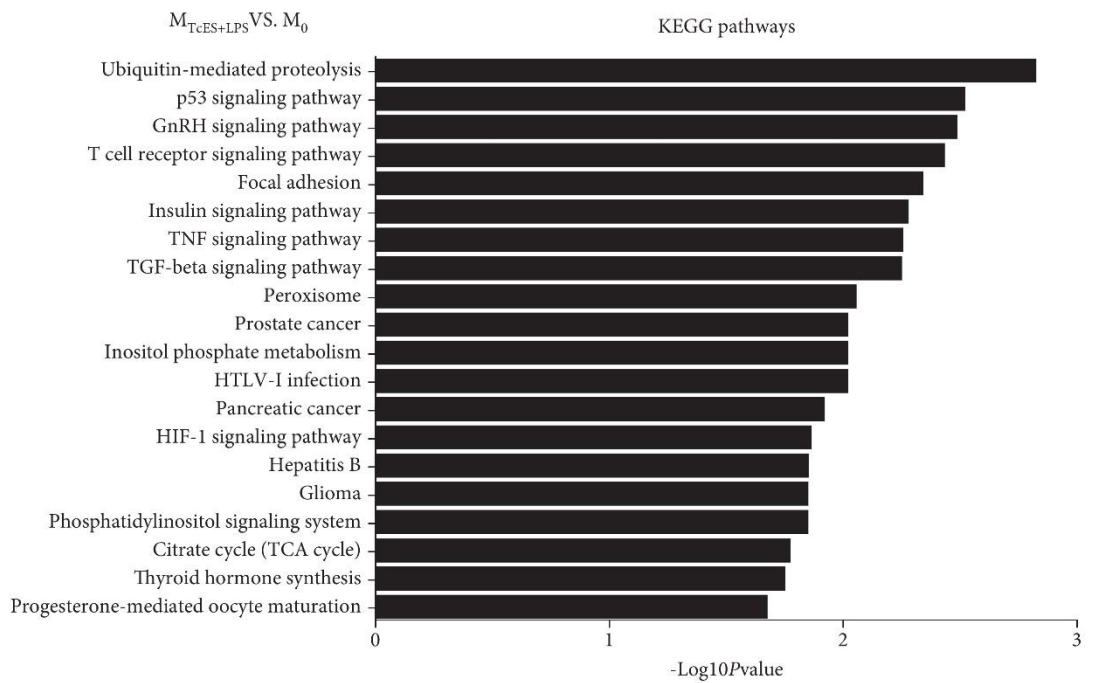
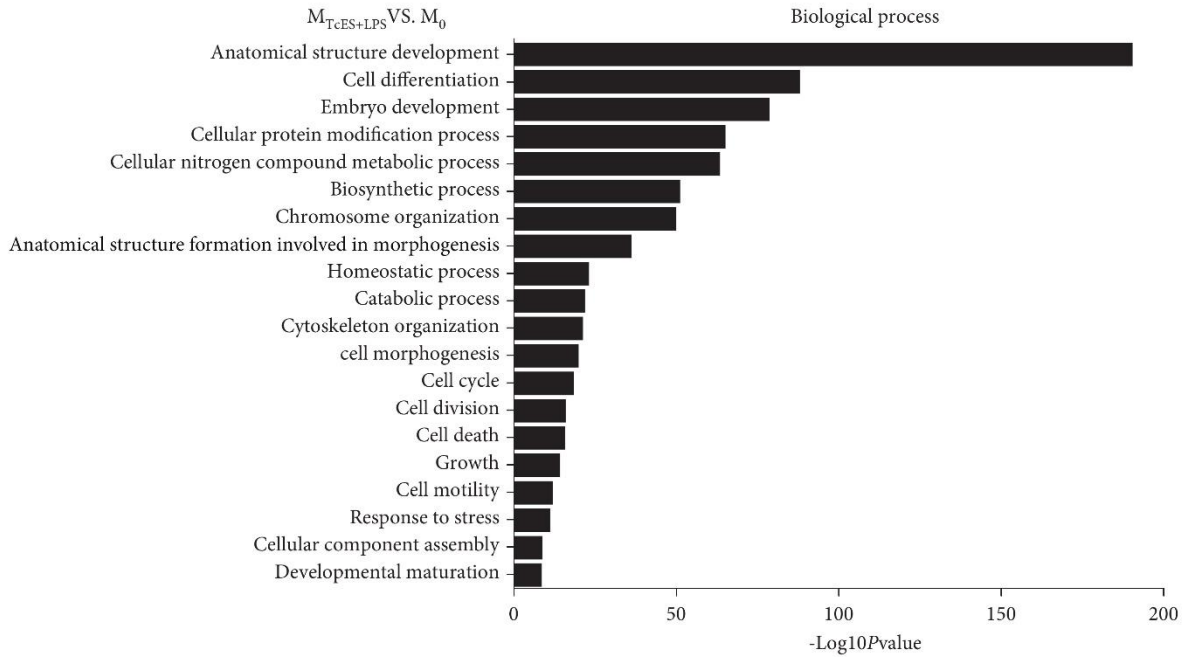
MTcES vs. M0				24 h poststimulus MTcES+LPS vs. M0				MLPS vs. M0			
Upregulated MicroRNA	FC	Downregulated MicroRNA	FC	Upregulated MicroRNA	FC	Downregulated MicroRNA	FC	Upregulated MicroRNA	FC	Downregulated MicroRNA	FC
mmu-miR-362-5p	77.49	mmu-miR-743b-5p	0.01	mmu-miR-155-5p	4272.7	mmu-miR-326-3p	0.48	mmu-miR-155-5p	14139.0	mmu-miR-2137	0.01
mmu-miR-421-3p	93.67	mmu-miR-1949	0.01	mmu-miR-210-3p	285.39	mmu-miR-361-5p	0.34	mmu-miR-1933-5p	901.35	mmu-miR-362-3p	0.01
mmu-miR-1929-5p	74.93	mmu-miR-2134	0.01	mmu-miR-674-5p	171.63	mmu-miR-27a-3p	0.32	mmu-miR-210-3p	639.8	mmu-miR-484	0.01
		mmu-miR-2137	0.01	mmu-miR-331-3p	127.7	mmu-miR-221-3p	0.29	mmu-miR-574-3p	579.11	mmu-miR-152-3p	0.01
				mmu-miR-7a-5p	109.76	mmu-miR-23a-3p	0.26	mmu-miR-673-3p	518.4	mmu-miR-714	0.005
				mmu-miR-574-3p	96.8	mmu-miR-27b-3p	0.26	mmu-miR-674-5p	331.59	mmu-miR-107-3p	0.004
				mmu-miR-467a-5p	92.80	mmu-miR-762	0.23	mmu-miR-466a-5p	308.23	mmu-miR-324-5p	0.004
				mmu-miR-1929-5p	88.81	mmu-miR-1224-5p	0.22	mmu-miR-489-3p	284.88	mmu-miR-148b-3p	0.003
				mmu-miR-489-3p	87.81	mmu-miR-199a-3p	0.01	mmu-miR-1900	261.532095	mmu-miR-350-3p	0.002
				mmu-miR-139-5p	83.82	mmu-miR-145-5p	0.01	mmu-miR-1953	242.8512311	mmu-miR-762	0.001

FC: fold change.



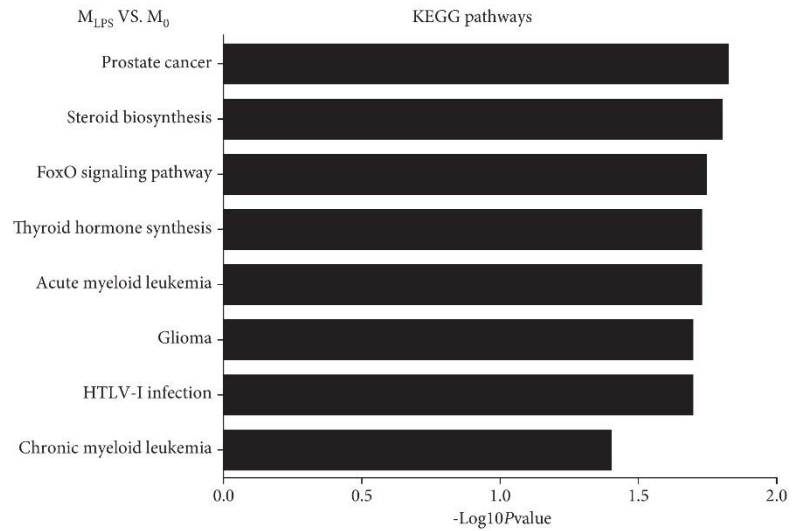
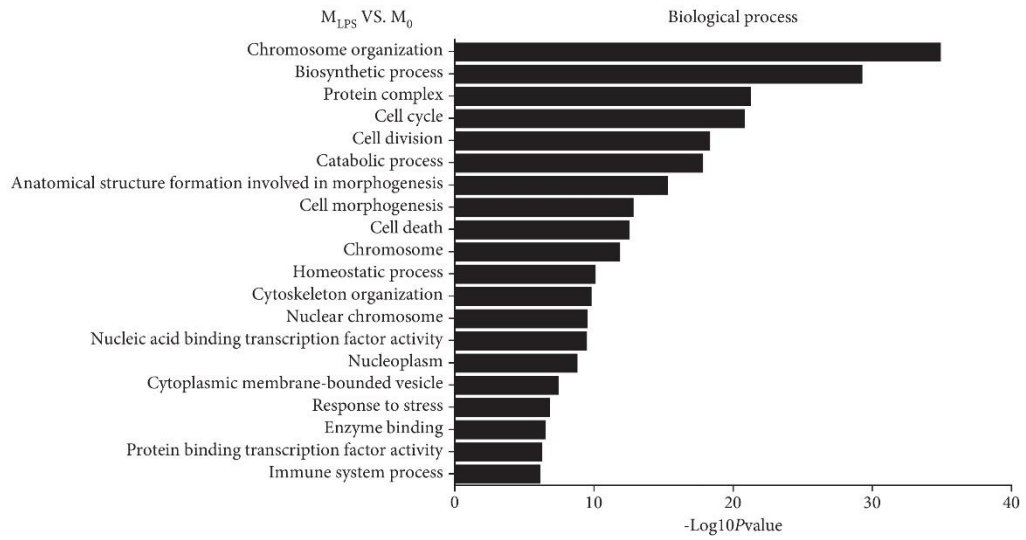
(a)

FIGURE 6: Continued.

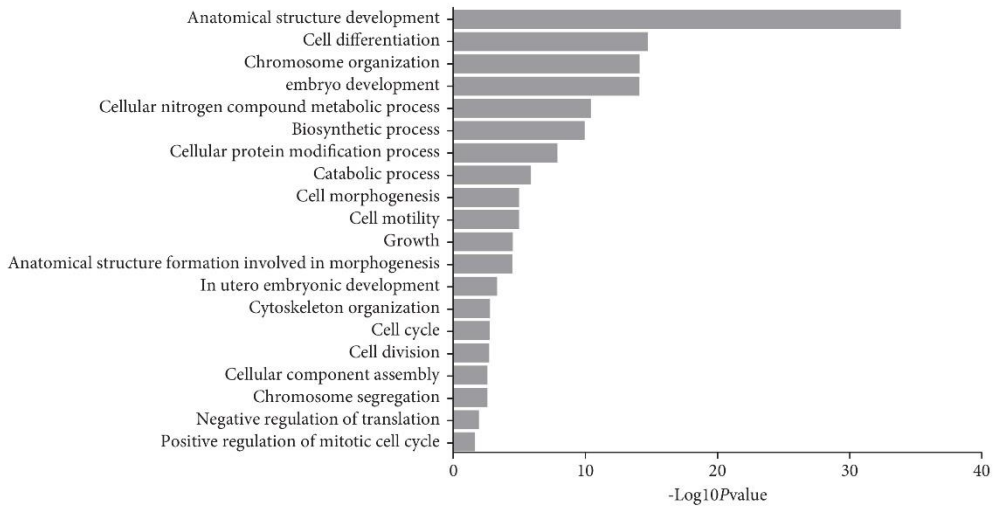


(b)

FIGURE 6: Continued.

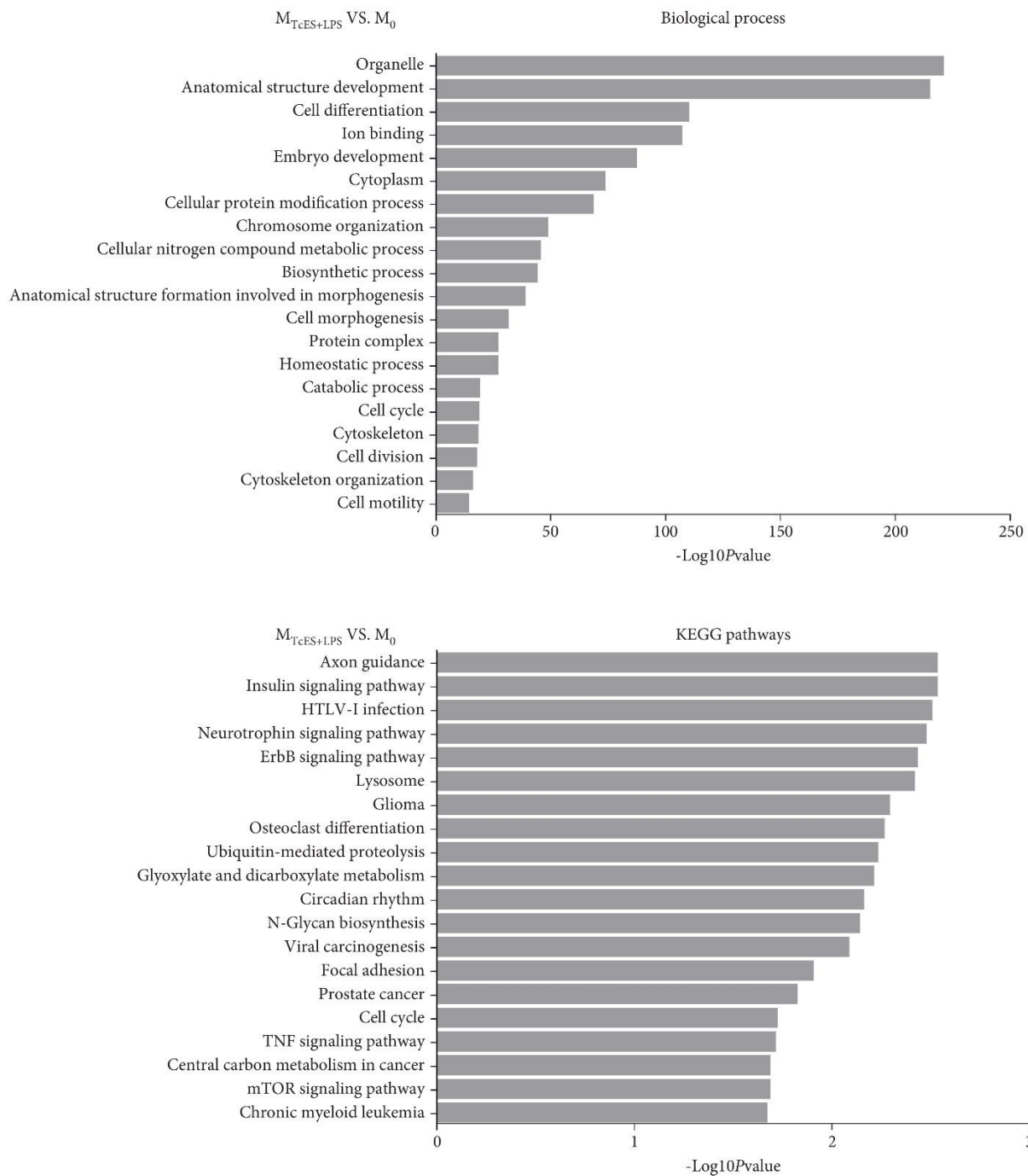


(c)



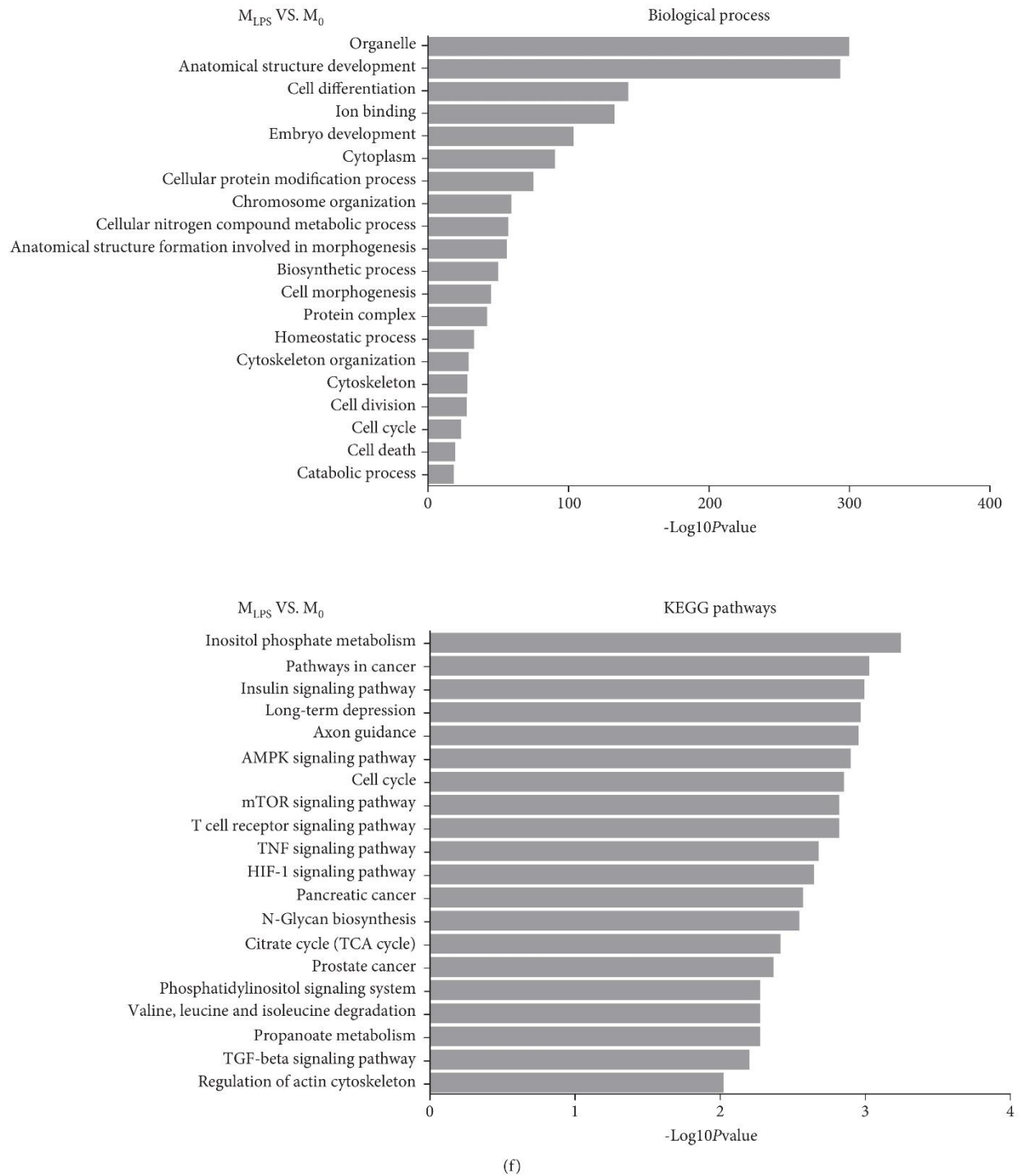
(d)

FIGURE 6: Continued.



(e)

FIGURE 6: Continued.



(f)

FIGURE 6: Top 20 of GO biological processes and KEGG pathways in M_{TcES} , $M_{TcES+LPS}$, and M_{LPS} at 4 (black) and 24 h poststimulus (gray). GO biological processes and KEGG pathways enriched by the upregulated differentially produced microRNAs between M_{TcES} vs. M_0 (a and d), $M_{TcES+LPS}$ vs. M_0 (b and e), and M_{LPS} vs. M_0 (c and f) at 4 h and 24 h poststimulus, respectively.

at 24 h post stimulus, which could be attributed to TcES's own recognition, as previously have been reported to recognize TcES [58]. These data suggest that posttranscriptional events may be involved in the regulatory mechanism triggered by TcES in regulating macrophage inflammatory responses.

microRNAs, small noncoding RNA molecules, have emerged as a key component of macrophage posttranscriptional regulation [59]. These molecules can silence the translation of mRNAs via base-pairing with complementary sequences within the RNA molecules. Hence, we further analyzed the microRNA profile in BMDM stimulated with

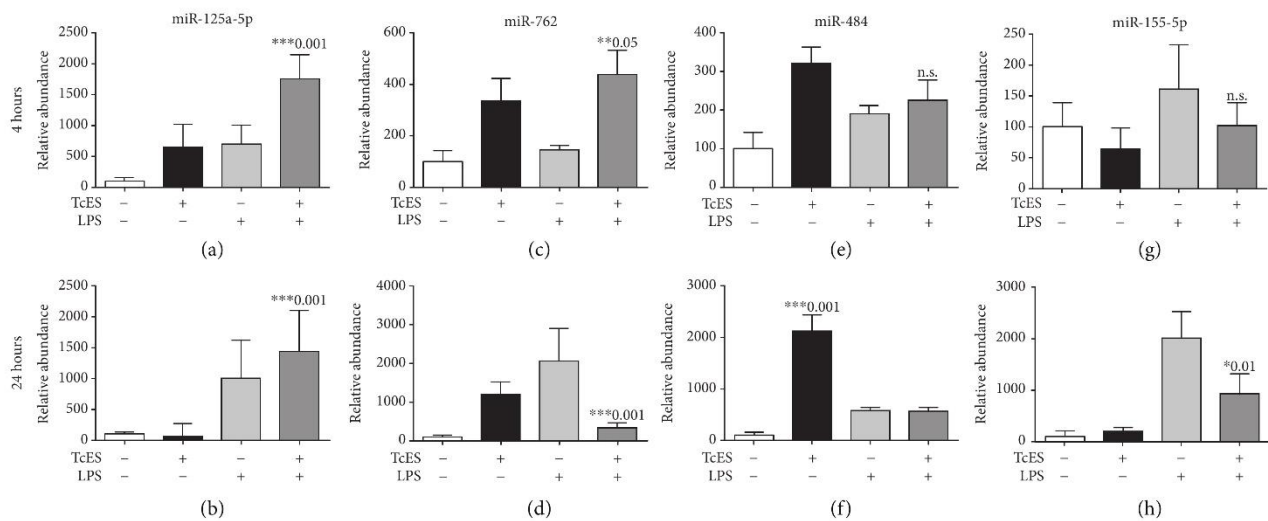


FIGURE 7: Validation and identification of microRNAs in stimulated BMDM. Macrophages were cultured in the presence of TcES (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or a combination of TcES+LPS for 4 (left bar) and 24 h poststimulus (right bar). Relative levels of selected microRNAs were determined by TaqMan miRNA assays after normalization with 18S RNA. MicroRNA levels are represented as fold change relative to PBS-treated BMDM (FC \pm SD). Data shown are representative of two independent experiments. Significance was calculated using *t*-test. **p* < 0.01, ***p* < 0.05, and ****p* < 0.001.

TcES alone or in combination with LPS. Our analysis demonstrated that $M_{\text{TcES+LPS}}$ shared regulatory microRNAs with M_{LPS} . For example, miR-146a-5p was upregulated in $M_{\text{TcES+LPS}}$ and M_{LPS} at 4h and only in $M_{\text{TcES+LPS}}$ at 24h poststimulus. This microRNA has been reported to dampen proinflammatory responses in macrophages through the inhibition of TLRs, NF- κ B, and STAT signaling pathways by targeting the mRNAs of *Traf6*, *Irak1*, *Irak2*, *Nfkb*, *Stat1*, and *Ap1* [60–63]. This evidence is supported by our KEGG enrichment analysis, which indicates that overproduced microRNAs in $M_{\text{TcES+LPS}}$ target mRNAs involved in NF- κ B, TNF, and MAPK signaling pathways. Of note, these data also confirm our hypothesis that TcES target proinflammatory pathways and support our previous findings indicating a role for TcES in blocking the IFN- γ /STAT1 signaling pathway in macrophages *in vitro* [17].

$M_{\text{TcES+LPS}}$ also overproduced microRNAs previously reported to target inflammatory mRNAs; for instance, let-7i and let-7e target *Tlr4* mRNA, which causes a drop in the recognition of proinflammatory antigens [64–66]. Moreover, miR-24-3p production in macrophages has been reported to significantly decrease the production of IL-6 and TNF α [67]. Furthermore, $M_{\text{TcES+LPS}}$ and M_{TcES} shared upregulated microRNAs previously reported to be elicited in macrophages exposed to *E. multilocularis* antigens (e.g., miR-146a-5p) and *S. japonicum* (miR-365 and miR-24) [14, 68]. These data suggest the presence of conserved antigens among helminths that could trigger similar posttranscriptional mechanisms to modulate immune responses in the host.

Finally, we selected four upregulated microRNAs to validate their levels by RT-qPCR and confirm the high quality of our array. We observed increased levels of miR-125a-5p in M_{TcES} and M_{LPS} , as early as 4h poststimulus. The combined stimulus with TcES and LPS induced an additive effect in the levels of this microRNA. miR-125a-5p has been reported to

increase after TLR2/4 signaling and has a key role in reducing the production of inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, and TNF α) by targeting NF- κ B and KLF4 signaling pathways [24, 69–71]. These data are associated with our previous studies suggesting that TcES is a ligand of TLR2 in phagocytic cells [58, 72]. In addition, miR-762 was selectively induced in M_{TcES} and $M_{\text{TcES+LPS}}$ at 4h poststimulus. miR-762 has been demonstrated to increase in ovarian and breast cancer and ocular tissue [73–75] where macrophages normally acquire an M2-like phenotype [76, 77]. Furthermore, by using bioinformatic tools, we found *Il12b*, *Il6*, *Tnf*, *Nfkb*, and *Cd86* mRNAs as possible targets of miR-762 in M_{TcES} and $M_{\text{TcES+LPS}}$. The microRNA miR-484 was found to be upregulated in all the groups of stimulated BMDM at 4h; however, its levels were only sustained in M_{TcES} at 24h poststimulation. miR-484 has been previously identified in multiple types of cancers [78–82] and the cerebral cortex [83]; such microenvironments are known to promote an anti-inflammatory phenotype in macrophages. Our bioinformatic analysis shows that *Il1b*, *Nfkb*, *Stat5a*, *Irf1*, *Myd88*, *Stat1*, and *IL-12a* mRNAs are possible targets for miR-484, which suggest a possible role for miR-484 in immune tolerance.

Lastly, we observed that miR-155-5p was upregulated in M_{LPS} at 4h and $M_{\text{TcES+LPS}}$ and M_{LPS} at 24h poststimulus. miR-155-5p is a well-defined microRNA induced by LPS in macrophages, which enhances the proinflammatory response by targeting the immunomodulatory mRNAs *Ship1*, *Socs1*, *Il13ra*, and *Clebp β* and increasing the half-life of *Tnf* [64, 84–88]. However, antigens of another helminth, *Angiostrongylus cantonensis*, also upregulated miR-155-5p [89]. Therefore, it would be of interest to further study the role of miR-155-5p during exposure to helminth antigens.

In summary, our study demonstrates a role for TcES in regulating the production of key inflammatory cytokines, possibly by inducing microRNAs that target inflammatory

transcripts and promoting the release of IL-10 in macrophages. This phenomenon shapes the transcriptomic profile of macrophages and consequently the outcome of the immune response. Although we found clear associations between TcES-induced microRNAs and mRNAs involved in multiple inflammatory pathways as their targets, our study has the limitation that we did not prove a direct interaction between microRNAs and mRNAs. Therefore, future studies in our laboratory will focus on elucidating the functional roles and significance of the different microRNAs described here. These findings increase our understanding of how released molecules from helminths regulate inflammation and may offer new approaches for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases.

Abbreviations

M2:	Alternatively activated-like macrophages
Arg1:	Arginase 1
EAE:	Autoimmune encephalomyelitis
BMDM:	Bone marrow-derived macrophages
M1:	Classical activation in macrophages
DAMPs:	Danger-associated molecular patterns
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's media
FBS:	Fetal bovine serum
FC:	Fold change (FC)
Fizz1:	Found in inflammatory zone
GO:	Gene ontology
HNP1:	Human neutrophil- α defensin
IL-4R α :	IL-4 receptor α
IGFBP5:	Insulin-like growth factor binding protein 5
IL-10:	Interleukin-10
IL-12:	Interleukin-12
IL-4:	Interleukin-4
IL-6:	Interleukin-6
KEGG:	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LPS:	Lipopolysaccharide
M-CSF:	Macrophage colony-stimulating factor
MHC:	Major histocompatibility complex
MR:	Mannose receptor
mRNAs:	Messenger RNAs
NO:	Nitric oxide
Nos2:	Nitric oxide synthase
PAMPs:	Pathogen-associated molecular patterns
PD-L2:	Programmed death ligand 2
TcES:	<i>Taenia crassiceps</i> -excreted/secreted antigens
TLR:	Toll-like receptor
TNF α :	Tumor necrosis factor α
UTR:	Untranslated region.

Data Availability

The array data used to support the findings of this study have been deposited in the GEO (Gene Expression Omnibus) database of the NCBI with the accession numbers GSE125170 for RNAm and GSE125171 for microRNA as part of the SuperSerie GSE125172 which are public once this article is published.

Conflicts of Interest

The authors have no financial or other conflicts to declare.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN220316 from DGAPA-PAPIIT-UNAM and A1-S-37879 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to LIT and by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, grant R21-AI120013, to SP-S. Diana Martínez-Saucedo is a PhD student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was supported by CONACYT 289850. BEC and J.D.R.R. received support from CONACYT.

Supplementary Materials

Table S1: sequence of primers used in RT-qPCRs to amplify the specified mRNAs (A) or microRNAs (B). Table S2: mRNAs commonly upregulated (≥ 2 -fold change) in BMDM with TcES (MTcES), LPS (MLPS), or TcES+LPS (MTcES+LPS) at both 4 (left) or 24 h (right) poststimulus. Table S3: transcripts up (A) or downregulated (B) at 4 or 24 h poststimulus with LPS (MLPS). Table S4: transcripts up (A) or downregulated (B) at 4 or 24 h poststimulus with TcES (MTcES). Table S5: transcripts up- (A) or downregulated (B) at 4 or 24 h poststimulus with TcES+LPS (MTcES+LPS). Table S6: mRNAs expressed differently (≥ 2 FC) between BMDM stimulated with TcES+LPS (MTcES+LPS) and with LPS (MLPS) at 4 (left) or 24 h (right). Table S7: microRNAs up- (A) or downregulated (B) at 4 or 24 h poststimulus with LPS (MLPS). Table S8: microRNAs up- (A) or downregulated (B) at 4 or 24 h poststimulus with TcES (MTcES). Table S9: microRNAs up- (A) or downregulated (B) at 4 (left) or 24 h (right) poststimulus with TcES+LPS (MTcES+LPS). Table S10: microRNAs upregulated (≥ 2 -fold change) in BMDM with TcES (MTcES), LPS (MLPS), and TcES+LPS (MTcES+LPS) at both 4 (left) or 24 h (right) poststimulus. Table S11: microRNAs expressed differently (≥ 2 FC) between BMDM with TcES+LPS (MTcES+LPS) and with LPS (MLPS) at 4 (left) or 24 h (right) poststimulus. Table S12: KEGG pathway analysis. Significantly enriched KEGG pathways ($p < 0.05$) are presented for BMDM with TcES (MTcES), TcES+LPS (MTcES+LPS), or LPS (MLPS) at 4 (left) or 24 h (right) poststimulus. Table S13: GO biological process annotations of the target genes of differentially expressed microRNAs. According to p value, GO terms of biological process are shown in BMDM with TcES (MTcES), TcES+LPS (MTcES+LPS), or LPS (MLPS) at 4 (left) or 24 h (right) poststimulus. (*Supplementary Materials*)

References

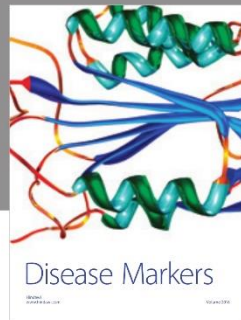
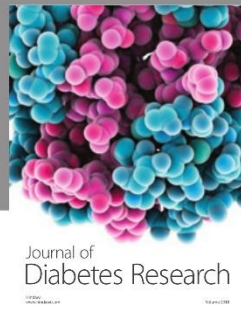
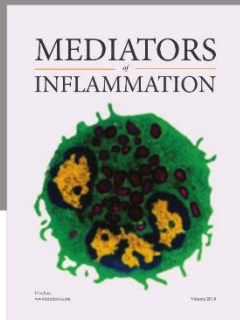
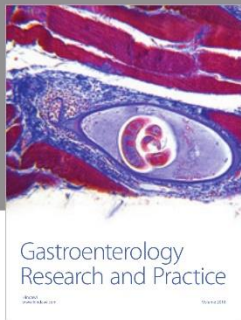
- [1] K. A. Jablonski, S. A. Amici, L. M. Webb et al., "Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, article e0145342, 2015.
- [2] S. Gordon and F. O. Martinez, "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions," *Immunity*, vol. 32, no. 5, pp. 593–604, 2010.

- [3] R. M. Maizels, "Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no. 6, pp. 481–486, 2016.
- [4] A. N. Peón, Y. Ledesma-Soto, J. E. Olguín, M. Bautista-Donis, E. Sciotto, and L. I. Terrazas, "Helminth products potently modulate experimental autoimmune encephalomyelitis by downregulating neuroinflammation and promoting a suppressive microenvironment," *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, Article ID 8494572, 16 pages, 2017.
- [5] A. Espinoza-Jiménez, R. de Haro, and L. I. Terrazas, "*Taenia crassiceps* antigens control experimental type 1 diabetes by inducing alternatively activated macrophages," *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, Article ID 8074329, 15 pages, 2017.
- [6] A. Espinoza-Jiménez, I. Rivera-Montoya, R. Cárdenas-Arreola, L. Morán, and L. I. Terrazas, "*Taenia crassiceps* infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 850541, 11 pages, 2010.
- [7] J. L. Reyes, A. F. Espinoza-Jiménez, M. I. González, L. Verdin, and L. I. Terrazas, "*Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis," *Cellular Immunology*, vol. 267, no. 2, pp. 77–87, 2011.
- [8] Y. Ledesma-Soto, B. E. Callejas, C. A. Terrazas et al., "Extraintestinal helminth infection limits pathology and proinflammatory cytokine expression during DSS-induced ulcerative colitis: a role for alternatively activated macrophages and prostaglandins," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 563425, 17 pages, 2015.
- [9] A. N. Peón, A. Espinoza-Jiménez, and L. I. Terrazas, "Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 498583, 13 pages, 2013.
- [10] J. L. Reyes, C. A. Terrazas, J. Alonso-Trujillo, N. van Rooijen, A. R. Satoskar, and L. I. Terrazas, "Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo," *International Journal for Parasitology*, vol. 40, no. 6, pp. 731–742, 2010.
- [11] L. I. Terrazas, D. Montero, C. A. Terrazas, J. L. Reyes, and M. Rodríguez-Sosa, "Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 13, pp. 1349–1358, 2005.
- [12] F. O. Martinez and S. Gordon, "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment," *F1000 Prime Reports*, vol. 6, p. 13, 2014.
- [13] P. Cai, G. N. Gobert, and D. P. McManus, "MicroRNAs in parasitic helminthiasis: current status and future perspectives," *Trends in Parasitology*, vol. 32, no. 1, pp. 71–86, 2016.
- [14] X. Guo and Y. Zheng, "MicroRNA expression profile in RAW264.7 macrophage cells exposed to *Echinococcus multilocularis* metacystodes," *Parasitology*, vol. 145, no. 3, pp. 416–423, 2018.
- [15] D. Rückerl, S. J. Jenkins, N. N. Laqtom et al., "Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo," *Blood*, vol. 120, no. 11, pp. 2307–2316, 2012.
- [16] D. P. Bartel, "MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–297, 2004.
- [17] M. Becerra-Díaz and L. I. Terrazas, "*Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ ," *International Journal for Parasitology*, vol. 44, no. 9, pp. 613–623, 2014.
- [18] S. Shicheng and J. Liu, "Isolation of mouse bone marrow-derived monocytes," 2015, PROTOCOL (Version 1) available at Protocol Exchange.
- [19] C. Terrazas, J. de Dios Ruiz-Rosado, S. A. Amici et al., "Helminth-induced Ly6C^{hi} monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, article 40814, 2017.
- [20] NanoString Technologies I, *nCounter: Expression Data Analysis Guide*, 2012.
- [21] NanoString Technologies I, *nCounter® Data Analysis Guidelines for miRNA*, 2010.
- [22] I. S. Vlachos, K. Zagganas, M. D. Paraskevopoulou et al., "DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support," *Nucleic Acids Research*, vol. 43, pp. W460–W466, 2015.
- [23] X. Jin, X. Guo, D. Zhu, M. Ayaz, and Y. Zheng, "miRNA profiling in the mice in response to *Echinococcus multilocularis* infection," *Acta Tropica*, vol. 166, pp. 39–44, 2017.
- [24] S. Banerjee, H. Cui, N. Xie et al., "miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 49, pp. 35428–35436, 2013.
- [25] Y. Li, R. Huang, L. Wang et al., "microRNA-762 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by targeting IRF7 expression," *Cell Proliferation*, vol. 48, no. 6, pp. 643–649, 2015.
- [26] S. León-Cabrera, B. E. Callejas, Y. Ledesma-Soto et al., "Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 10, no. 9, pp. 948–956, 2014.
- [27] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, and M. Munder, "Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, p. 532, 2014.
- [28] P. N. Adams, A. Aldridge, K. V. Vukman, S. Donnelly, and S. M. O'Neill, "*Fasciola hepatica* tegumental antigens indirectly induce an M2 macrophage-like phenotype in vivo," *Parasite Immunology*, vol. 36, no. 10, pp. 531–539, 2014.
- [29] S. Huber, R. Hoffmann, F. Muskens, and D. Voehringer, "Alternatively activated macrophages inhibit T cell proliferation by STAT6-dependent expression of PD-L2," *Blood*, vol. 116, no. 17, pp. 3311–3320, 2010.
- [30] P. G. Fallon, H. E. Jolin, P. Smith et al., "IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13," *Immunity*, vol. 17, no. 1, pp. 7–17, 2002.
- [31] T. Yoshimoto, "The hunt for the source of primary interleukin-4: how we discovered that natural killer T cells and basophils determine T helper type 2 cell differentiation *In Vivo*," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, p. 716, 2018.
- [32] P. Dirgahayu, S. Fukumoto, K. Miura, and K. Hirai, "Excretory/secretory products from plerocercoids of *Spirometra erinaeuropeae* suppress the TNF- α gene expression by reducing phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK in macrophages," *International Journal for Parasitology*, vol. 32, no. 9, pp. 1155–1162, 2002.

- [33] L. Chen, K. V. N. Rao, Y.-X. He, and K. Ramaswamy, "Skin-stage Schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 37, pp. 34329–34335, 2002.
- [34] K. Ramaswamy, B. Salafsky, S. Potluri, Y. He, J. W. Li, and T. Shibuya, "Secretion of an anti-inflammatory, immunomodulatory factor by Schistosomulae of *Schistosoma mansoni*," *Journal of Inflammation*, vol. 46, no. 1, pp. 13–22, 1995.
- [35] H. S. Goodridge, E. H. Wilson, W. Harnett, C. C. Campbell, M. M. Harnett, and F. Y. Liew, "Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 2, pp. 940–945, 2001.
- [36] X. Bai, X. Wu, X. Wang et al., "Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 360, no. 1–2, pp. 79–88, 2012.
- [37] A. Chauhan, Y. Sun, B. Pani et al., "Helminth induced suppression of macrophage activation is correlated with inhibition of calcium channel activity," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, article e101023, 2014.
- [38] S. Donnelly, C. M. Stack, S. M. O'Neill, A. A. Sayed, D. L. Williams, and J. P. Dalton, "Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages," *The FASEB Journal*, vol. 22, no. 11, pp. 4022–4032, 2008.
- [39] C. M. Hamilton, D. J. Dowling, C. E. Loscher, R. M. Morphew, P. M. Brophy, and S. M. O'Neill, "The *fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function," *Infection and Immunity*, vol. 77, no. 6, pp. 2488–2498, 2009.
- [40] S. Almeida, P. Nejsun, and A. R. Williams, "Modulation of human macrophage activity by *Ascaris* antigens is dependent on macrophage polarization state," *Immunobiology*, vol. 223, no. 4–5, pp. 405–412, 2018.
- [41] A. Zawistowska-Deniziak, K. Basalaj, B. Strojny, and D. Młocicki, "New data on human macrophages polarization by *hymenolepis diminuta* tapeworm—an *in vitro* study," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 148, 2017.
- [42] J. D. Ng Yan Hing, M. Desjardins, and A. Descoteaux, "Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C- α in phagosome maturation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 319, no. 3, pp. 810–816, 2004.
- [43] F. O. Martinez, L. Helming, R. Milde et al., "Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: Similarities and differences," *Blood*, vol. 121, no. 9, pp. e57–e69, 2013.
- [44] M. Rehli, S. Sulzbacher, S. Pape et al., "Transcription factor Tfec contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor," *The Journal of Immunology*, vol. 174, no. 11, pp. 7111–7122, 2005.
- [45] W. H. Busby Jr, T.-J. Nam, A. Morales, C. Smith, M. Jennings, and D. R. Clemmons, "The complement component C1s is the protease that accounts for cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in fibroblast medium," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 48, pp. 37638–37644, 2000.
- [46] F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression," *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 10, pp. 7303–7311, 2006.
- [47] A. J. Fleetwood, H. Dinh, A. D. Cook, P. J. Hertzog, and J. A. Hamilton, "GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 86, no. 2, pp. 411–421, 2009.
- [48] S. K. Biswas and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 10, pp. 889–896, 2010.
- [49] C. Luo, M. Chen, A. Madden, and H. Xu, "Expression of complement components and regulators by different subtypes of bone marrow-derived macrophages," *Inflammation*, vol. 35, no. 4, pp. 1448–1461, 2012.
- [50] A. T. Naito, T. Sumida, S. Nomura et al., "Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes," *Cell*, vol. 149, no. 6, pp. 1298–1313, 2012.
- [51] Y. Cai, B. H. D. Teo, J. G. Yeo, and J. Lu, "C1q protein binds to the apoptotic nucleolus and causes C1 protease degradation of nucleolar proteins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 37, pp. 22570–22580, 2015.
- [52] F. K. Kerr, G. O'Brien, N. S. Quinsey et al., "Elucidation of the substrate specificity of the C1s protease of the classical complement pathway," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 47, pp. 39510–39514, 2005.
- [53] H. Eriksson and M. H. Nissen, "Proteolysis of the heavy chain of major histocompatibility complex class I antigens by complement component C1s," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1037, no. 2, pp. 209–215, 1990.
- [54] F. Bouchonnet, N. Boechat, M. Bonay, and A. J. Hance, "Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *mycobacterium bovis* bcg," *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 6, pp. 3020–3025, 2002.
- [55] Y. Kumagai, O. Takeuchi, H. Kato et al., "Alveolar macrophages are the primary interferon- α producer in pulmonary infection with RNA viruses," *Immunity*, vol. 27, no. 2, pp. 240–252, 2007.
- [56] M. Brook, G. H. Tomlinson, K. Miles et al., "Neutrophil-derived alpha defensins control inflammation by inhibiting macrophage mRNA translation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 16, pp. 4350–4355, 2016.
- [57] J. Wehkamp, M. Schmid, and E. F. Stange, "Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease," *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 23, no. 4, pp. 370–378, 2007.
- [58] J. L. Reyes, M. I. González, Y. Ledesma-Soto, A. R. Satoskar, and L. I. Terrazas, "TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 1323–1333, 2011.
- [59] J. B. Self-Fordham, A. R. Naqvi, J. R. Uttamani, V. Kulkarni, and S. Nares, "MicroRNA: dynamic regulators of macrophage polarization and plasticity," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 1062, 2017.
- [60] C. G. R. Perry, G. J. F. Heigenhauser, A. Bonen, and L. L. Spriet, "High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle," *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, vol. 33, no. 6, pp. 1112–1123, 2008.

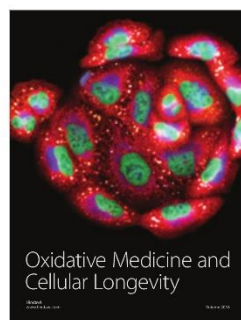
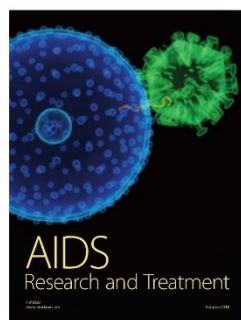
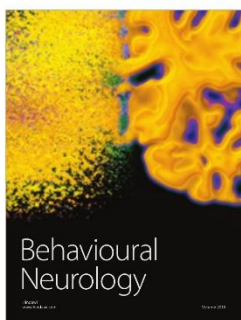
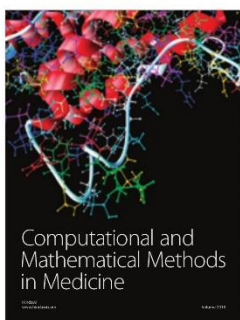
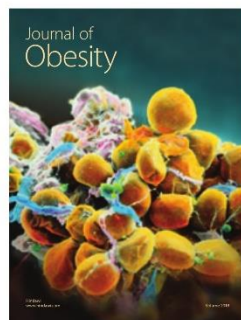
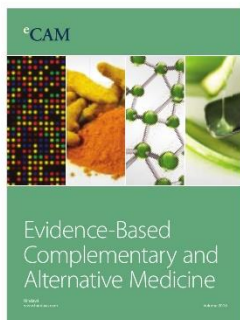
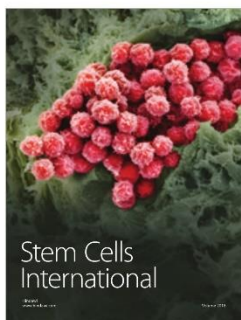
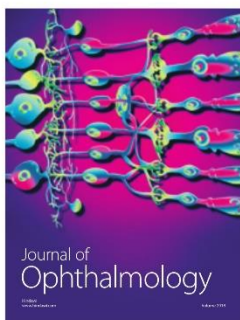
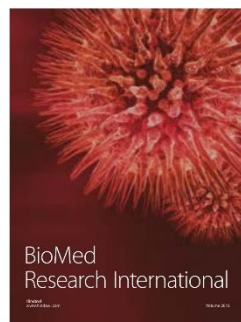
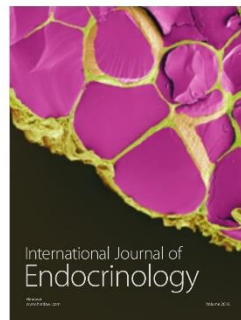
- [61] K. D. Taganov, M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore, "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 33, pp. 12481–12486, 2006.
- [62] C. Perske, N. Lahat, S. S. Levin, H. Bitterman, B. Hemmerlein, and M. A. Rahat, "Loss of inducible nitric oxide synthase expression in the mouse renal cell carcinoma cell line RENCA is mediated by microRNA miR-146a," *The American Journal of Pathology*, vol. 177, no. 4, pp. 2046–2054, 2010.
- [63] A. R. Naqvi, S. Zhong, H. Dang, J. B. Fordham, S. Nares, and A. Khan, "Expression profiling of LPS responsive miRNA in primary human macrophages," *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, vol. 8, no. 2, pp. 136–143, 2016.
- [64] E. Tili, J.-J. Michaille, A. Cimino et al., "Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock," *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 8, pp. 5082–5089, 2007.
- [65] X.-M. Chen, P. L. Splinter, S. P. O'Hara, and N. F. LaRusso, "A cellular micro-RNA, *let-7i*, regulates toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 39, pp. 28929–28938, 2007.
- [66] A. J. Murphy, P. M. Guyre, and P. A. Pioli, "Estradiol suppresses NF- κ B activation through coordinated regulation of *let-7a* and miR-125b in primary human macrophages," *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 9, pp. 5029–5037, 2010.
- [67] Z. Jingjing, Z. Nan, W. Wei et al., "MicroRNA-24 modulates *Staphylococcus aureus*-induced macrophage polarization by suppressing CHI3L1," *Inflammation*, vol. 40, no. 3, pp. 995–1005, 2017.
- [68] H. Han, J. Peng, Y. Hong et al., "MicroRNA expression profile in different tissues of BALB/c mice in the early phase of *Schistosoma japonicum* infection," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 188, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [69] X. Zhao, Y. Tang, B. Qu et al., "MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 62, no. 11, pp. 3425–3435, 2010.
- [70] T. Chen, Z. Huang, L. Wang et al., "MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages," *Cardiovascular Research*, vol. 83, no. 1, pp. 131–139, 2009.
- [71] D. W. Melton, X. Lei, J. A. L. Gelfond, and P. K. Shireman, "Dynamic macrophage polarization-specific miRNA patterns reveal increased soluble VEGF receptor 1 by miR-125a-5p inhibition," *Physiological Genomics*, vol. 48, no. 5, pp. 345–360, 2016.
- [72] C. A. Terrazas, M. Alcántara-Hernández, L. Bonifaz, L. I. Terrazas, and A. R. Satoskar, "Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway," *The FASEB Journal*, vol. 27, no. 11, pp. 4547–4560, 2013.
- [73] R. Hou, Z. Yang, S. Wang et al., "miR-762 can negatively regulate menin in ovarian cancer," *OncoTargets and Therapy*, vol. 10, pp. 2127–2137, 2017.
- [74] M. Karali, I. Peluso, V. A. Gennarino et al., "miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 715, 2010.
- [75] Y. Shi, Y. Jia, W. Zhao, L. Zhou, X. Xie, and Z. Tong, "Histone deacetylase inhibitors alter the expression of molecular markers in breast cancer cells via microRNAs," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 42, no. 1, pp. 435–442, 2018.
- [76] C. E. Lewis and J. W. Pollard, "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments," *Cancer Research*, vol. 66, no. 2, pp. 605–612, 2006.
- [77] J. Mun, C. Tam, G. Chan, J. H. Kim, D. Evans, and S. Fleiszig, "MicroRNA-762 is upregulated in human corneal epithelial cells in response to tear fluid and *Pseudomonas aeruginosa* antigens and negatively regulates the expression of host defense genes encoding RNase7 and ST2," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, article e57850, 2013.
- [78] E. Pashaei, E. Pashaei, M. Ahmady, M. Ozen, and N. Aydin, "Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy," *PLoS One*, vol. 12, no. 6, article e0179543, 2017.
- [79] V. Sansoni, S. Perego, G. Vernillo et al., "Effects of repeated sprints training on fracture risk-associated miRNA," *Oncotarget*, vol. 9, no. 26, pp. 18029–18040, 2018.
- [80] E. Seclaman, D. Narita, A. Anghel et al., "MicroRNA expression in laser micro-dissected breast cancer tissue samples – a pilot study," *Pathology & Oncology Research*, vol. 25, no. 1, pp. 233–239, 2019.
- [81] Y. Hu, H. Xie, Y. Liu, W. Liu, M. Liu, and H. Tang, "miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells," *Cancer Cell International*, vol. 17, p. 36, 2017.
- [82] S. Zearo, E. Kim, Y. Zhu et al., "MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 200, 2014.
- [83] R. Yi, J. Feng, S. Yang et al., "miR-484/MAP2/c-Myc-positive regulatory loop in glioma promotes tumor-initiating properties through ERK1/2 signaling," *Journal of Molecular Histology*, vol. 49, no. 2, pp. 209–218, 2018.
- [84] M. He, Z. Xu, T. Ding, D.-M. Kuang, and L. Zheng, "MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBP β ," *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 6, no. 5, pp. 343–352, 2009.
- [85] B. Tang, B. Xiao, Z. Liu et al., "Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of *Helicobacter pylori*-induced inflammation," *FEBS Letters*, vol. 584, no. 8, pp. 1481–1486, 2010.
- [86] S. Bala, M. Marcos, K. Kodys et al., "Up-regulation of MicroRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor α (TNF α) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 2, pp. 1436–1444, 2011.
- [87] M. V. S. Rajaram, B. Ni, J. D. Morris et al., "Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 42, pp. 17408–17413, 2011.

- [88] C. Cunha, C. Gomes, A. R. Vaz, and D. Brites, "Exploring new inflammatory biomarkers and pathways during LPS-induced M1 polarization," *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 6986175, 17 pages, 2016.
- [89] Z.-X. Mo, J.-Q. Guo, D. She et al., "Infection by the nematode *Angiostrongylus cantonensis* induces differential expression of miRNAs in mouse brain," *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, vol. 51, no. 1, pp. 94–102, 2018.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com



10.2 PRIMERS DE RNAm Y microRNA

RNAm	Secuencia (5' a 3')
<i>Il10</i>	TCTCCTAGCCAATAAAGTATAGAGC[G/A]CCAGCAGGATCTTATAAGTTTCTCA
<i>Il6</i>	GATCCAGGCAGCAACAAAAAGTGGG[T/C]AAATGTAAAGAATGTTATGTA AAT
<i>Tnf</i>	ATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGA[A/C]CCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCC
<i>Nos2</i>	CTCTAACAGGCTGCTATGTCTGCAT[C/T]TGCCTGGACCAGGGAGGAAGGGGCT
<i>Arg1</i>	TTGACTGACTGGAGAGCTCAAGTGC[A/C]GCAAAGAGAAGTGTGTCAGAGCATGAG
<i>Il1b</i>	CAGGTGCATCGTGCACATAAGCCTC[G/T]TTATCCCATGTGTCGAAGAAGATAG
<i>Stat1</i>	TGTGAAAGATGTAATAAAATACACA[T/C]TTTCCCCTACCAGATCCATGATGG
<i>Stat6</i>	AGATGCAGCAGGCAGGGCCCTCTC[AT/-]ACACTGGAGGGCCACATGGCCAGGC
<i>Il12b</i>	AAGTGGGGTGA AAGGAGTCTGGGGC[G/A]GTACAAAAGGGCCTCTGGAACCTTG
<i>Cd86</i>	GAATAGTTAACCAAGTGCTAAATCC[G/A]TGTTTTCAAATGTGGTCAGGTACC
<i>Chi3l3</i>	CAGGGTCCCAGGACTGCCCTGAG[G/T]CTGAAGTCCCTTTACCTGTCTCTC

microRNA	Número de acceso en la miRBase	Secuencia madura
mmu-miR-125a-5p	MIMAT0000135	UCCUGAGACCCUUAACCUUGUGA
mmu-miR-155-5p	MIMAT0000165	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
mmu-miR-484	MIMAT0003127	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU
mmu-miR-762	MIMAT0003892	GGGGCUGGGGCCGGGACAGAGC

10.3 RNAm CON MAYOR ACUMULACIÓN EN M_{LPS}

4 h posestímulo				24 h posestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
RNAm	M ₀	M _{LPS}	M _{LPS}	RNAm	M ₀	M _{LPS}	M _{LPS}
Citocinas				Citocinas			
<i>Il6</i>	1.0	5140.9	5140.9	<i>Il12a</i>	1.0	252.8	252.8
<i>Il1a</i>	11.7	49078.2	4198.0	<i>Il6</i>	1.0	165.3	165.3
<i>Il12b</i>	1.0	957.3	957.3	<i>Il12b</i>	1.0	95.5	95.5
<i>Il12a</i>	1.0	739.4	739.4	<i>Il3</i>	1.0	71.1	71.1
<i>Ifnb1</i>	1.0	244.8	244.8	<i>Il1b</i>	719.4	44290.1	61.6
<i>Il10</i>	1.0	199.1	199.1	<i>Ifnb1</i>	1.0	30.7	30.7
<i>Il3</i>	1.0	192.6	192.6	<i>Tnf</i>	35.3	368.0	10.4
<i>Il1b</i>	719.4	138467.7	192.5	<i>Il15</i>	41.6	182.1	4.4
<i>Il15</i>	41.6	5850.8	140.5	<i>Il18</i>	82.5	299.0	3.6
<i>Il23a</i>	1.0	33.4	33.4	<i>Tnfaip3</i>	459.9	1499.3	3.3
<i>Csf2</i>	1.0	20.4	20.4	Receptor de citocina			
<i>Il18</i>	82.5	1415.3	17.2	<i>Il23r</i>	1.0	215.8	215.8
<i>Csf1</i>	177.7	2981.3	16.8	<i>Il1rn</i>	108.8	1135.1	10.4
<i>Il7</i>	1.0	16.5	16.5	Quimiocina			
Receptor de citocina				<i>Ccl5</i>	29.8	89728.8	3007.4
<i>Il1rn</i>	108.8	1690.7	15.5	<i>Cxcl3</i>	1.0	823.1	823.1
<i>Il1rap</i>	131.4	419.7	3.2	<i>Cxcl9</i>	1.0	332.7	332.7
Quimiocina				<i>Cxcl10</i>	29.8	1354.7	45.4
<i>Cxcl3</i>	1.0	2285.7	2285.7	<i>Ccl22</i>	9.0	401.7	44.8
<i>Cxcl10</i>	29.8	66103.7	2215.6	<i>Cxcl1</i>	44.4	839.9	18.9
<i>Cxcl9</i>	1.0	1699.8	1699.8	<i>Ccl3</i>	244.9	3527.3	14.4
<i>Ccl22</i>	9.0	4844.7	540.2	<i>Cxcl2</i>	48.0	676.7	14.1
<i>Cxcl1</i>	44.4	13364.7	301.3	Receptor de quimiocina			
<i>Cxcl2</i>	48.0	10504.2	218.9	<i>Cxcr1</i>	4.4	776.8	175.2
<i>Ccl7</i>	18.9	4018.7	212.1	<i>Ccr7</i>	1.0	90.4	90.4
<i>Ccl17</i>	1.0	188.7	188.7	Receptor			
<i>Ccl2</i>	276.6	40108.1	145.0	<i>Cd40</i>	5.3	685.1	128.3
<i>Ccl8</i>	1.0	131.3	131.3	<i>Ager</i>	1.0	13.9	13.9
<i>Ccl20</i>	1.0	24.3	24.3	<i>Tlr1</i>	224.0	2779.5	12.4
<i>Ccl24</i>	33.5	533.2	15.9	<i>Cxcr2</i>	1.00	7.18	7.18
<i>Cxcl5</i>	1.0	2.1	2.1	<i>Ptgir</i>	9.9	50.9	5.2
Receptor de quimiocina				<i>Tlr3</i>	24.4	118.2	4.8
<i>Cxcr1</i>	4.4	2313.1	521.8	<i>Traf2</i>	70.7	340.3	4.8
Receptor				<i>Cysltr1</i>	219.5	708.7	3.2
<i>Ccr3</i>	17.13	39.94	2.33	<i>Ptger1</i>	1.00	2.97	2.97
<i>Cd55</i>	1.0	4.7	4.7	<i>Cysltr2</i>	8.97	26.52	2.96
<i>Cd86</i>	159.6	1004.3	6.3	<i>Ccr1</i>	128.73	287.27	2.23
<i>Cysltr2</i>	9.0	23.0	2.6	<i>Ccr4</i>	1.00	2.13	2.13
<i>Ly96</i>	690.3	1647.6	2.4	<i>Tlr9</i>	53.4	109.0	2.0
<i>Nod1</i>	5.3	303.5	56.8	<i>Tlr6</i>	295.7	596.8	2.0
<i>Ptger1</i>	1.00	4.71	4.71	Factor de transcripción			
<i>Ptger4</i>	87.0	295.7	3.4	<i>Cebpb</i>	1696.5	4240.6	2.5
<i>Ptgfr</i>	1.0	8.6	8.6	<i>Ddit3</i>	204.9	758.3	3.7
<i>Tlr1</i>	224.0	2317.1	10.3	<i>Hif1a</i>	1866.1	5984.2	3.2
<i>Tlr2</i>	404.5	3422.3	8.5	<i>Irf1</i>	675.8	1416.1	2.1
<i>Tlr3</i>	24.4	324.4	13.3	<i>Irf7</i>	113.3	7850.7	69.3
<i>Tlr6</i>	295.7	1331.8	4.5	<i>Mafg</i>	23.5	90.4	3.9
<i>Tlr7</i>	316.5	1205.2	3.8	<i>Stat1</i>	242.1	3753.6	15.5
<i>Tlr9</i>	53.4	120.8	2.3	<i>Stat2</i>	139.6	1426.2	10.2

<i>Traf2</i>	70.7	484.9	6.9	<i>Stat3</i>	590.52	1214.20	2.06
Factor de transcripción				Proteínas inflamatorias			
<i>Irf7</i>	113.3	4702.5	41.5	<i>Oasl1</i>	33.5	4271.7	127.6
<i>Irf1</i>	675.8	21990.3	32.5	<i>Ltb4r1</i>	1.0	21.5	21.5
<i>Stat2</i>	139.6	2695.5	19.3	<i>Lta</i>	1.0	3.8	3.8
<i>Stat1</i>	242.1	3469.3	14.3	<i>Myd88</i>	295.66	686.81	2.32
<i>Nfkb1</i>	451.7	4328.0	9.6	<i>Nlrp3</i>	113.3	251.1	2.2
<i>Mafk</i>	60.7	370.1	6.1	Enzima			
<i>Stat3</i>	590.5	3140.5	5.3	<i>Ptgs2</i>	4.4	640.5	144.5
<i>Cebpb</i>	1696.5	7491.1	4.4	<i>Arg1</i>	1.0	40.0	40.0
<i>Relb</i>	566.9	2224.4	3.9	<i>Nos2</i>	21.7	717.1	33.1
<i>Rela</i>	462.6	1774.2	3.8	<i>Mapkapk5</i>	1.0	19.0	19.0
<i>Nr3c1</i>	551.5	2015.6	3.7	<i>Oas1a</i>	469.9	5426.6	11.5
<i>Max</i>	174.1	629.8	3.6	<i>Oas2</i>	42.5	411.8	9.7
<i>Hif1a</i>	1866.1	6550.3	3.5	<i>Nox1</i>	1.00	8.86	8.86
<i>Irf5</i>	1036.9	3041.3	2.9	<i>Flt1</i>	1.00	2.97	2.97
<i>Bcl6</i>	52.5	132.6	2.5	<i>Ptk2</i>	72.5	213.3	2.9
<i>Tcf4</i>	858.2	2156.5	2.5	<i>Mapkapk2</i>	361.0	862.6	2.4
Proteína inflamatoria				<i>Map2k1</i>	1115.82	2237.01	2.00
<i>Ptgs2</i>	4.4	24080.8	5432.4	Proteínas del complemento			
<i>Oasl1</i>	33.5	16894.5	504.8	<i>Cfb</i>	1.0	17948.5	17948.5
<i>Tslp</i>	1.0	29.5	29.5	<i>C3</i>	89.7	2762.7	30.8
<i>Nlrp3</i>	113.3	2969.5	26.2	<i>C4a</i>	1.7	11.4	6.7
<i>Myd88</i>	295.7	1941.2	6.6	<i>C8a</i>	1.00	4.65	4.65
Enzimas				<i>C9</i>	1.00	2.13	2.13
<i>Nos2</i>	21.7	1667.2	76.9	Proteínas antiapoptóticas			
<i>Tnfaip3</i>	459.9	17487.0	38.0	<i>Hsh2d</i>	1.0	8.9	8.9
<i>Pla2g4a</i>	12.6	468.0	37.1	Proteínas antivirales			
<i>Ripk2</i>	58.9	1560.2	26.5	<i>Ifit1</i>	38.9	4153.1	106.7
<i>Oas2</i>	42.5	697.6	16.4	<i>Ifit2</i>	251.2	23439.4	93.3
<i>Oas1a</i>	469.9	6466.8	13.8	<i>Ifit3</i>	110.6	8825.6	79.8
<i>Flt1</i>	1.00	9.93	9.93	<i>Mx1</i>	132.4	3067.2	23.2
<i>Arg1</i>	1.0	9.9	9.9	Otras			
<i>Mapkapk2</i>	361.0	3174.4	8.8	<i>Ifi44</i>	626.8	19276.6	30.8
<i>Map2k1</i>	1115.8	3995.2	3.6	<i>Daxx</i>	46.2	251.9	5.5
<i>Map2k4</i>	491.6	1577.2	3.2	<i>Fxyd2</i>	1.00	3.81	3.81
<i>Map3k5</i>	232.2	537.1	2.3	<i>Rapgef2</i>	187.7	660.7	3.5
Proteínas del complemento				<i>Prkcb</i>	366.4	1134.3	3.1
<i>C3</i>	89.7	2563.7	28.6	<i>Ifi27l2a</i>	2205.4	6384.6	2.9
Proteínas inmunes				<i>Keap1</i>	127.8	290.6	2.3
<i>Chi3l3</i>	24.39	55.60	2.28				
Otras							
<i>Ifi44</i>	626.8	29527.6	47.1				
<i>Daxx</i>	46.2	1625.4	35.2				
<i>Rapgef2</i>	187.7	1744.2	9.3				
<i>Kng1</i>	4.4	23.0	5.2				
<i>Birc2</i>	300.2	1110.0	3.7				
<i>Keap1</i>	127.8	458.8	3.6				
<i>Ifi27l2a</i>	2205.4	5259.7	2.4				
<i>Gnb1</i>	3558.2	7253.6	2.0				
FC- Veces de cambios							

10.4 RNAm CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{TcES}

4 h postestímulo				24 h postestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
RNA _m	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}	RNA _m	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}
Citocinas				Citocinas			
<i>Ifna1</i>	5.3	14.9	2.8	<i>Ifna1</i>	5.34	19.53	3.66
Quimiocinas				Factores de transcripción			
<i>Ccl21a</i>	1.00	6.25	6.25	<i>Maff</i>	4.4	8.9	2.0
Factores de transcripción				Enzimas			
<i>Irf3</i>	1.0	8.8	8.8	<i>Prkca</i>	1.00	12.15	12.15
<i>Mafg</i>	23.5	72.5	3.1	<i>Alox5</i>	1.00	8.87	8.87
Proteínas asociadas a inflamación				Enzimas			
<i>Defa1</i>	1.0	8.0	8.0	<i>Map2k6</i>	2.6	13.8	5.3
Enzimas				Proteínas asociadas a inflamación			
<i>Ptgs1</i>	44.35	91.43	2.06	<i>Plcb1</i>	1.71	8.87	5.18
Proteínas complementarias				Enzimas			
<i>C1s1</i>	1.0	6.3	6.3	<i>Defa1</i>	1.00	3.13	3.13
Proteínas antivirales				Enzimas			
<i>Hspb1</i>	1.0	4.5	4.5	<i>Map3k9</i>	1.00	3.13	3.13
Otras				Proteínas antivirales			
<i>Prkca</i>	1.00	7.97	7.97	<i>Myl2</i>	1.71	3.95	2.31
<i>Mbl2</i>	1.00	4.53	4.53	<i>Hspb1</i>			
				1.0 4.8 4.8			

4 h postestímulo				24 h postestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
RNA _m	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}	RNA _m	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}
Citocinas				Citocinas			
<i>Tnfsf14</i>	11.69	5.39	0.46	<i>Il1b</i>	719.35	313.81	0.44
<i>Il12b</i>	1.00	0.23	0.23	Quimiocinas			
<i>Il23a</i>	1.00	0.23	0.23	<i>Cxcl2</i>	47.98	21.17	0.44
<i>Il1b</i>	719.35	106.92	0.15	<i>Cxcl10</i>	29.84	1.00	0.03
Quimiocinas				Receptores			
<i>Cxcl1</i>	44.35	20.02	0.45	<i>Ccl24</i>	33.47	8.87	0.27
Receptores				Factores de transcripción			
<i>Cxcr1</i>	4.43	1.00	0.23	<i>Cd86</i>	159.57	44.94	0.28
Factores de transcripción				Factores de transcripción			
<i>Elk1</i>	1.00	0.23	0.23	<i>Tlr2</i>	404.53	99.86	0.25
Proteínas asociadas a inflamación				Factores de transcripción			
<i>Lta</i>	1.00	0.23	0.23	<i>Cebpb</i>	1696.47	590.88	0.35
Enzimas				Proteínas asociadas a inflamación			
<i>Flt1</i>	1.00	0.23	0.23	<i>Relb</i>	566.93	265.45	0.47
Proteínas complementarias				Enzimas			
<i>C2</i>	1.00	0.23	0.23	<i>Nlrp3</i>	113.30	53.95	0.48
Otras				Enzimas			
<i>Kng1</i>	4.43	1.95	0.44	<i>Nos2</i>	21.67	7.23	0.33
				Otras			
				<i>Ifit1</i>			
				38.91 11.33 0.29			

FC- Veces de cambios

10.5 RNAm CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{TcES+LPS}

4 h postestímulo				24 h postestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
RNAm	M ₀	M _{TcES+LPS}	M _{TcES+LPS}	RNAm	M ₀	M _{TcES+LPS}	M _{TcES+LPS}
Citocinas				Citocinas			
<i>Il6</i>	1.0	5974.7	5974.7	<i>Il12a</i>	1.0	338.7	338.7
<i>Il1a</i>	11.7	41578.9	3556.5	<i>Il6</i>	1.0	194.2	194.2
<i>Il12a</i>	1.0	626.2	626.2	<i>Il12b</i>	1.0	99.9	99.9
<i>Il12b</i>	1.0	582.3	582.3	<i>Il3</i>	1.0	82.1	82.1
<i>Ifnb1</i>	1.0	291.1	291.1	<i>Il1b</i>	719.4	43835.0	60.9
<i>Il10</i>	1.0	287.9	287.9	<i>Ifnb1</i>	1.0	21.4	21.4
<i>Il3</i>	1.0	188.7	188.7	<i>Tnf</i>	35.3	401.6	11.4
<i>Il1b</i>	719.4	117249.3	163.0	<i>Tnfaip3</i>	459.9	1755.8	3.8
<i>Il15</i>	41.6	5982.8	143.7	<i>Il15</i>	41.6	153.4	3.7
<i>Il23a</i>	1.0	19.5	19.5	<i>Il18</i>	82.5	256.0	3.1
<i>Il18</i>	82.5	1577.8	19.1	<i>Il2</i>	1.0	2.5	2.5
<i>Csf1</i>	177.7	3380.1	19.0	<i>Il5</i>	1.0	2.5	2.5
<i>Il17a</i>	1.0	16.2	16.2	Receptores de citocinas			
<i>Il7</i>	1.0	16.2	16.2	<i>Il23r</i>	1.0	206.8	206.8
<i>Csf2</i>	1.0	11.3	11.3	<i>Il1rn</i>	108.8	1069.8	9.8
<i>Tnfsf14</i>	11.7	42.3	3.6	Quimiocinas			
<i>Ifna1</i>	5.3	13.0	2.4	<i>Ccl5</i>	29.8	80194.4	2687.8
Receptores de citocinas				<i>Cxcl3</i>	1.0	1206.0	1206.0
<i>Il1rn</i>	108.8	1415.1	13.0	<i>Cxcl9</i>	1.0	410.0	410.0
<i>Il1rap</i>	131.4	448.9	3.4	<i>Cxcl10</i>	29.8	1158.8	38.8
Quimiocinas				<i>Ccl22</i>	9.0	340.8	38.0
<i>Cxcl3</i>	1.0	2527.8	2527.8	<i>Cxcl1</i>	44.4	1399.7	31.6
<i>Cxcl10</i>	29.8	61463.1	2060.0	<i>Cxcl2</i>	48.0	956.7	19.9
<i>Cxcl9</i>	1.0	1285.0	1285.0	<i>Ccl3</i>	244.9	4687.4	19.1
<i>Ccl22</i>	9.0	5981.2	666.9	Receptores de quimiocinas			
<i>Cxcl1</i>	44.4	13942.0	314.3	<i>Cxcr1</i>	4.4	778.6	175.7
<i>Cxcl2</i>	48.0	11523.2	240.2	<i>Ccr7</i>	1.0	68.5	68.5
<i>Ccl7</i>	18.9	4372.4	230.7	Receptores			
<i>Ccl17</i>	1.0	182.1	182.1	<i>Cd40</i>	5.3	831.0	155.6
<i>Ccl8</i>	1.0	174.0	174.0	<i>Ager</i>	1.0	20.3	20.3
<i>Ccl2</i>	276.6	47309.6	171.0	<i>Tlr1</i>	224.0	2895.4	12.9
<i>Ccl20</i>	1.0	14.6	14.6	<i>Ptgir</i>	9.9	62.2	6.3
<i>Ccl24</i>	33.5	466.8	13.9	<i>Traf2</i>	70.7	355.5	5.0
<i>Cxcl5</i>	1.0	9.7	9.7	<i>Tlr3</i>	24.4	87.4	3.6
Receptores de quimiocinas				<i>Cysltr1</i>	219.5	583.8	2.7
<i>Cxcr1</i>	4.4	2010.5	453.6	<i>Tlr2</i>	404.5	975.6	2.4
Receptores				<i>Tlr6</i>	295.7	646.7	2.2
<i>Nod1</i>	5.3	300.9	56.3	<i>Tlr9</i>	53.4	111.5	2.1
<i>Ptgfr</i>	1.0	24.4	24.4	Factores de transcripción			
<i>Ccr7</i>	1.0	21.1	21.1	<i>Cebpb</i>	1696.5	4187.8	2.5
<i>Tlr3</i>	24.4	349.7	14.3	<i>Irf7</i>	113.3	7191.7	63.5
<i>Tlr5</i>	1.0	11.3	11.3	<i>Stat1</i>	242.1	3513.3	14.5
<i>Tlr1</i>	224.0	2529.4	11.3	<i>Stat2</i>	139.6	1264.6	9.1
<i>Tlr2</i>	404.5	3925.1	9.7	<i>Mafg</i>	23.5	101.0	4.3
<i>Traf2</i>	70.7	642.5	9.1	<i>Ddit3</i>	204.9	859.3	4.2
<i>Cd55</i>	1.0	8.1	8.1	<i>Maff</i>	4.4	14.1	3.2
<i>Cd86</i>	159.6	1119.1	7.0	<i>Hif1a</i>	1866.1	5799.7	3.1
<i>Tlr6</i>	295.7	1618.5	5.5	<i>Irf1</i>	675.8	1592.5	2.4

<i>Cysltr2</i>	9.0	43.9	4.9
<i>Tlr7</i>	316.5	1496.5	4.7
<i>Ptger4</i>	87.0	401.7	4.6
<i>Tlr9</i>	53.4	222.8	4.2
<i>Ly96</i>	690.3	1566.4	2.3

Factores de transcripción

<i>Irf7</i>	113.3	5034.5	44.4
<i>Irf1</i>	675.8	25450.6	37.7
<i>Stat2</i>	139.6	2469.2	17.7
<i>Stat1</i>	242.1	3679.5	15.2
<i>Elk1</i>	1.0	13.0	13.0
<i>Irf3</i>	1.0	11.3	11.3
<i>Nfkb1</i>	451.7	4432.6	9.8
<i>Mapk</i>	60.7	413.1	6.8
<i>Stat3</i>	590.5	3123.1	5.3
<i>Cebpb</i>	1696.5	8634.2	5.1
<i>Max</i>	174.1	722.2	4.1
<i>Rela</i>	462.6	1914.5	4.1
<i>Relb</i>	566.9	2218.7	3.9
<i>Hif1a</i>	1866.1	6838.4	3.7
<i>Nr3c1</i>	551.5	2008.9	3.6
<i>Mapg</i>	23.5	81.3	3.5
<i>Irf5</i>	1036.9	3428.9	3.3
<i>Tcf4</i>	858.2	2269.1	2.6
<i>Bcl6</i>	52.5	112.2	2.1

Proteínas inflamatorias

<i>Ptgs2</i>	4.4	27069.1	6106.5
<i>Oasl1</i>	33.5	19093.6	570.6
<i>Nlrp3</i>	113.3	3093.9	27.3
<i>Tslp</i>	1.0	26.0	26.0
<i>Lta</i>	1.0	8.1	8.1
<i>Myd88</i>	295.7	2036.5	6.9
<i>Defa-rs1</i>	1.0	6.5	6.5
<i>Ltb</i>	20.8	52.0	2.5

Enzimas

<i>Nos2</i>	21.7	1747.0	80.6
<i>Pla2g4a</i>	12.6	518.9	41.2
<i>Tnfaip3</i>	459.9	18595.9	40.4
<i>Ripk2</i>	58.9	1828.3	31.1
<i>Oas2</i>	42.5	772.6	18.2
<i>Oas1a</i>	469.9	6735.9	14.3
<i>Mapkapk2</i>	361.0	3969.0	11.0
<i>Plcb1</i>	1.7	14.6	8.5
<i>Masp1</i>	1.0	4.8	4.8
<i>Map2k1</i>	1115.8	3978.8	3.6
<i>Map2k4</i>	491.6	1657.5	3.4
<i>Arg1</i>	1.0	3.2	3.2
<i>Map3k5</i>	232.2	570.9	2.5

Proteínas del complemento

<i>C3</i>	89.7	3211.0	35.8
<i>C2</i>	1.0	29.2	29.2
<i>C1s</i>	1.0	4.8	4.8

Proteínas antivirales

<i>Hspb1</i>	1.0	13.0	13.0
--------------	-----	------	------

Proteínas proapoptóticas

<i>Bcl2l1</i>	135.1	270.0	2.0
---------------	-------	-------	-----

Otras

Proteínas inflamatorias

<i>Oasl1</i>	33.5	4026.5	120.3
<i>Ltb4r1</i>	1.0	29.8	29.8
<i>Lta</i>	1.0	12.0	12.0
<i>Areg</i>	1.00	2.54	2.5
<i>Nlrp3</i>	113.3	252.9	2.2

Enzimas

<i>Ptgs2</i>	4.4	914.8	206.4
<i>Nos2</i>	21.7	448.7	20.7
<i>Oas1a</i>	469.9	5380.8	11.5
<i>Mapkapk5</i>	1.0	9.9	9.9
<i>Oas2</i>	42.5	398.4	9.4
<i>Arg1</i>	1.0	6.7	6.7
<i>Map2k6</i>	2.6	7.8	3.0
<i>Ptk2</i>	72.5	193.2	2.7
<i>Mapkapk2</i>	361.0	857.2	2.4

Proteínas complementarias

<i>Cfb</i>	1.0	19872.2	19872.2
<i>C3</i>	89.7	2816.8	31.4
<i>C4a</i>	1.7	10.9	6.4

Proteínas antiapoptóticas

<i>Hsh2d</i>	1.0	23.5	23.5
--------------	-----	------	------

Proteínas antivirales

<i>Ifit1</i>	38.9	4186.8	107.6
<i>Ifit2</i>	251.2	24552.9	97.7
<i>Ifit3</i>	110.6	9369.2	84.7
<i>Mx1</i>	132.4	2876.5	21.7
<i>Hspb1</i>	1.0	5.7	5.7

Otras

<i>Ifi44</i>	626.8	18743.1	29.9
<i>Daxx</i>	46.2	236.1	5.1
<i>Rapgef2</i>	187.7	656.1	3.5
<i>Prkcb</i>	366.4	1040.5	2.8
<i>Keap1</i>	127.8	333.5	2.6
<i>Iifi27l2a</i>	2205.4	5327.4	2.4

<i>Jfi44</i>	626.8	32324.9	51.6
<i>Daxx</i>	46.2	1706.3	37.0
<i>Gngt1</i>	1.0	13.0	13.0
<i>Rapgef2</i>	187.7	1613.6	8.6
<i>Kng1</i>	4.4	29.2	6.6
<i>Keap1</i>	127.8	549.8	4.3
<i>Birc2</i>	300.2	1169.5	3.9
<i>Jfi27l2a</i>	2205.4	6130.8	2.8
<i>Gnb1</i>	3558.2	7863.2	2.2

FC-Veces de cambios

10.6 RNAm PRODUCIDOS DIFERENCIALMENTE ENTRE M_{TcES+LPS} Y M_{LPS}

4 h postestímulo						24 h postestímulo					
Cuentas normalizadas			FC (comparado con M ₀)			Cuentas normalizadas			FC (comparado con M ₀)		
RNAm	M ₀	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	RNAm	M ₀	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}
Citocinas						Citocinas					
<i>Il17a</i>	1.00	16.23	1.00	16.23	1.00	<i>Il2</i>	1.00	2.54	1.29	2.54	1.29
<i>Tnfsf14</i>	11.69	42.25	22.97	3.61	1.97	<i>Il5</i>	1.00	2.54	1.00	2.54	1.00
<i>Ifna1</i>	5.34	12.97	1.00	2.43	0.19	Quimiocinas					
Receptores de quimiocinas						<i>Ccl21a</i>	1.00	1.00	2.13	1.00	2.13
<i>Ccr3</i>	17.13	1.00	39.94	0.06	2.33	Receptores de quimiocinas					
<i>Ccr7</i>	1.00	21.11	1.00	21.11	1.00	<i>Cxcr2</i>	1.00	1.00	7.18	1.00	7.18
Receptores						<i>Ccr1</i>	128.73	240.30	287.27	1.87	2.23
<i>Ptger1</i>	1.00	1.00	4.71	1.00	4.71	<i>Ccr4</i>	1.00	1.00	2.13	1.00	2.13
<i>Tlr5</i>	1.00	11.35	1.00	11.35	1.00	Receptores					
Factores de transcripción						<i>Cysltr2</i>	8.97	5.69	26.52	0.63	2.96
<i>Irf3</i>	1.00	11.35	1.00	11.35	1.00	<i>Ptger1</i>	1.00	1.00	2.97	1.00	2.97
<i>Elk1</i>	1.00	12.97	0.79	12.97	0.79	<i>Tlr2</i>	404.53	975.55	802.04	2.41	1.98
<i>Mafg</i>	23.49	81.29	33.41	3.46	1.42	Receptores de quimiocinas					
Proteínas inflamatorias						<i>Maff</i>	4.43	14.06	1.00	3.17	0.23
<i>Defa-rs1</i>	1.00	6.47	1.00	6.47	1.00	<i>Stat3</i>	590.52	1101.23	1214.20	1.86	2.06
<i>Lta</i>	1.00	8.09	1.00	8.09	1.00	Proteínas inflamatorias					
<i>Ltb</i>	20.76	52.01	32.11	2.50	1.55	<i>Areg</i>	1.00	2.54	1.00	2.54	1.00
Enzimas						<i>Myd88</i>	295.66	588.02	686.81	1.99	2.32
<i>Flt1</i>	1.00	1.00	9.93	1.00	9.93	Enzimas					
<i>Masp1</i>	1.00	4.84	1.00	4.84	1.00	<i>Flt1</i>	1.00	1.00	2.97	1.00	2.97
<i>Plcb1</i>	1.71	14.60	0.79	8.53	0.46	<i>Map2k1</i>	1115.82	2197.83	2237.01	1.97	2.00
Proteínas del complemento						<i>Map2k6</i>	2.62	7.78	3.81	2.97	1.46
<i>C1s</i>	1.00	4.84	1.00	4.84	1.00	<i>Nox1</i>	1.00	1.00	8.86	8.85	1.00
<i>C2</i>	1.00	29.24	1.00	29.24	1.00	Proteínas del complemento					
Proteínas inmunes						<i>C8a</i>	1.00	1.00	4.65	1.00	4.65
<i>Chi3l3</i>	24.39	42.25	55.60	1.73	2.28	<i>C9</i>	1.00	1.00	2.13	1.00	2.13
Proteínas antivirales						Proteínas antivirales					
<i>Hspb1</i>	1.00	12.97	1.00	12.97	1.00	<i>Hspb1</i>	1.00	5.69	1.00	5.69	1.00
Proteínas proapoptóticas						Otras					
<i>Bcl2l1</i>	135.08	269.98	191.31	2.00	1.42	<i>Fxyd2</i>	1.00	1.00	3.81	1.00	3.81
Otras											
<i>Gngt1</i>	1.00	12.97	1.00	12.97	1.00						
FC-Veces de cambios											

10.7 microRNA CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{LPS}

4 h postestímulo				24 h postestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
microRNA	M ₀	M _{LPS}	M _{LPS}	microRNA	M ₀	M _{LPS}	M _{LPS}
mmu-miR-155-5p	1.0	402.6	402.6	mmu-miR-155-5p	1.0	14139.0	14139.0
mmu-miR-546	1.0	76.7	76.7	mmu-miR-1933-5p	1.0	901.4	901.4
mmu-miR-146a-5p	2586.8	5416.2	2.1	mmu-miR-210-3p	1.0	639.8	639.8
				mmu-miR-574-3p	1.0	579.1	579.1
				mmu-miR-673-3p	1.0	518.4	518.4
				mmu-miR-674-5p	1.0	331.6	331.6
				mmu-miR-466a-5p	1.0	308.2	308.2
				mmu-miR-489-3p	1.0	284.9	284.9
				mmu-miR-1900	1.0	261.5	261.5
				mmu-miR-1953	1.0	242.9	242.9
				mmu-miR-743a-3p	1.0	238.2	238.2
				mmu-miR-1982-3p	1.0	238.2	238.2
				mmu-miR-410-3p	1.0	233.5	233.5
				mmu-miR-3474	1.0	219.5	219.5
				mmu-miR-539-5p	1.0	205.5	205.5
				mmu-miR-1929-5p	1.0	205.5	205.5
				mmu-miR-362-5p	1.0	200.8	200.8
				mmu-miR-876-5p	1.0	186.8	186.8
				mmu-miR-1839-3p	1.0	182.1	182.1
				mmu-miR-7a-5p	1.0	158.8	158.8
				mmu-miR-544-3p	1.0	158.8	158.8
				mmu-miR-344-3p	1.0	154.1	154.1
				mmu-miR-467c-5p	1.0	154.1	154.1
				mmu-miR-882	1.0	149.4	149.4
				mmu-miR-1936	1.0	149.4	149.4
				mmu-miR-139-3p	1.0	144.8	144.8
				mmu-miR-200b-3p	1.0	144.8	144.8
				mmu-miR-501-3p	1.0	140.1	140.1
				mmu-miR-712-5p	1.0	140.1	140.1
				mmu-miR-141-3p	1.0	135.4	135.4
				mmu-miR-367-3p	1.0	135.4	135.4
				mmu-miR-467a-5p	1.0	135.4	135.4
				mmu-miR-1193-3p	1.0	135.4	135.4
				mmu-miR-298-5p	1.0	130.8	130.8
				mmu-miR-495-3p	1.0	130.8	130.8
				mmu-miR-380-3p	1.0	126.1	126.1
				mmu-miR-100-5p	1.0	121.4	121.4
				mmu-miR-411-5p	1.0	121.4	121.4
				mmu-miR-547-3p	1.0	121.4	121.4
				mmu-miR-764-5p	1.0	121.4	121.4
				mmu-miR-1892	1.0	121.4	121.4
				mmu-miR-335-3p	1.0	116.8	116.8
				mmu-miR-568	1.0	116.8	116.8
				mmu-miR-376a-3p	300.6	5006.5	16.7
				mmu-miR-691	385.2	4371.3	11.3
				mmu-miR-101b-3p	175.7	1919.5	10.9
				mmu-miR-1955-5p	621.0	5800.4	9.3
				mmu-miR-190b-5p	680.2	6314.1	9.3
				mmu-miR-2183	166.3	1331.0	8.0

mmu-miR-1951	469.8	3680.1	7.8
mmu-miR-1902	545.9	4175.2	7.6
mmu-miR-222-3p	682.1	5081.2	7.4
mmu-miR-664-3p	168.2	1162.9	6.9
mmu-miR-377-3p	75.2	476.4	6.3
mmu-miR-125a-5p	588.1	3301.8	5.6
mmu-miR-195-5p	126.8	635.1	5.0
mmu-miR-742-3p	101.5	495.0	4.9
mmu-let-7i-5p	4784.0	22823.3	4.8
mmu-miR-743b-5p	98.6	457.7	4.6
mmu-miR-1981-5p	188.8	854.6	4.5
mmu-miR-193b-3p	701.8	3152.4	4.5
mmu-miR-466g	129.7	574.4	4.4
mmu-miR-99b-5p	143.7	625.8	4.4
mmu-let-7e-5p	532.7	2311.8	4.3
mmu-miR-3471	210.4	887.3	4.2
mmu-miR-136-5p	145.6	597.8	4.1
mmu-miR-496a-3p	142.8	574.4	4.0
mmu-miR-30a-5p	211.4	840.6	4.0
mmu-miR-30e-5p	96.8	364.3	3.8
mmu-miR-741-3p	656.7	2433.2	3.7
mmu-miR-1949	124.0	439.0	3.5
mmu-miR-297c-5p	100.5	345.6	3.4
mmu-miR-188-5p	384.3	1232.9	3.2
mmu-let-7a-5p	6897.3	20815.9	3.0
mmu-miR-22-3p	21580.5	64187.4	3.0
mmu-miR-154-5p	559.9	1601.9	2.9
mmu-miR-99a-5p	1065.4	3031.0	2.8
mmu-miR-130a-3p	124.0	340.9	2.7
mmu-miR-374b-5p	155.0	415.6	2.7
mmu-miR-130b-3p	296.9	765.9	2.6
mmu-miR-98-5p	507.3	1251.6	2.5
mmu-miR-328-3p	118.4	284.9	2.4
mmu-miR-1839-5p	134.3	312.9	2.3
mmu-miR-101a-3p	379.6	868.7	2.3
mmu-let-7f-5p	5009.4	11325.3	2.3
mmu-let-7c-5p	3099.4	6888.6	2.2
mmu-miR-652-3p	251.8	546.4	2.2
mmu-miR-378-3p	510.2	1078.8	2.1
mmu-miR-21a-5p	23295.1	48957.9	2.1
mmu-miR-199a-3p	74.2	154.1	2.1

microRNA disminuidos en M_{LPS}

4 h posestímulo				24 h posestímulo			
Cuentas normalizadas			FC (comparado con M ₀)	Cuentas normalizadas			FC (comparado con M ₀)
microRNA	M ₀	M _{LPS}	M _{LPS}	microRNA	M ₀	M _{LPS}	M _{LPS}
mmu-miR-762	350.2	155.8	0.44	mmu-miR-338-3p	262.1	126.1	0.5
mmu-miR-125a-3p	300.0	100.2	0.33	mmu-miR-27b-3p	732.8	340.9	0.5
mmu-miR-1224-5p	1674.3	514.4	0.31	mmu-miR-301a-3p	502.6	214.8	0.4
mmu-miR-380-3p	61.3	1.0	0.02	mmu-miR-1224-5p	1633.8	513.7	0.3
mmu-miR-467f	61.3	1.0	0.02	mmu-miR-103-3p	801.4	238.2	0.3
mmu-miR-539-5p	61.3	1.0	0.02	mmu-miR-23a-3p	9293.6	1732.7	0.2
mmu-miR-467c-5p	62.8	1.0	0.02	mmu-miR-27a-3p	10683.1	1956.8	0.2
mmu-miR-714	66.0	1.0	0.02	mmu-miR-221-3p	2241.7	368.9	0.2
mmu-miR-489-3p	92.7	1.0	0.01	mmu-miR-24-3p	3130.4	471.7	0.2
mmu-miR-2137	102.1	1.0	0.01	mmu-miR-15b-5p	2720.8	368.9	0.1

mmu-miR-804	130.4	1.0	0.01	mmu-miR-29b-3p	6290.0	695.9	0.1
				mmu-miR-145-5p	95.8	1.0	0.01
				mmu-miR-208b-3p	96.8	1.0	0.01
				mmu-miR-340-3p	101.5	1.0	0.01
				mmu-miR-365-3p	114.6	1.0	0.01
				mmu-miR-423-3p	116.5	1.0	0.01
				mmu-miR-1983	127.8	1.0	0.01
				mmu-miR-185-5p	136.2	1.0	0.01
				mmu-miR-2137	146.6	1.0	0.01
				mmu-miR-362-3p	148.4	1.0	0.01
				mmu-miR-484	178.5	1.0	0.01
				mmu-miR-152-3p	186.0	1.0	0.01
				mmu-miR-714	205.8	1.0	0.005
				mmu-miR-107-3p	232.1	1.0	0.004
				mmu-miR-324-5p	248.0	1.0	0.004
				mmu-miR-148b-3p	368.3	1.0	0.003
				mmu-miR-350-3p	637.0	1.0	0.002
				mmu-miR-762	701.8	1.0	0.001

FC-Veces de cambios

10.8 microRNA CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{TcES}

4 h postestímulo				24 h postestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
microRNA	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}	microRNA	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}
mmu-miR-421-3p	1.0	102.6	102.6	mmu-miR-421-3p	1.0	93.7	93.7
mmu-miR-714	66.0	211.3	3.2	mmu-miR-362-5p	1.0	77.5	77.5
mmu-miR-484	130.4	306.4	2.4	mmu-miR-1929-5p	1.0	74.9	74.9
mmu-miR-350-3p	248.2	550.8	2.2	mmu-miR-743b-5p	98.6	1.0	0.0
mmu-miR-148b-3p	155.5	333.4	2.1	mmu-miR-2134	120.3	1.0	0.0
mmu-miR-125a-3p	300.0	638.8	2.1	mmu-miR-1949	124.0	1.0	0.0
mmu-miR-191-5p	281.1	596.0	2.1	mmu-miR-2137	146.6	1.0	0.0
mmu-miR-30b-5p	763.3	1593.9	2.1				
mmu-miR-103-3p	406.8	844.0	2.1				

microRNA disminuidos en M_{TcES}

4 h postestímulo				24 h postestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)	
microRNA	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}	microRNA	M ₀	M _{TcES}	M _{TcES}
mmu-miR-190b-5p	1909.9	870.9	0.5	mmu-miR-743b-5p	98.6	1.0	0.01
mmu-miR-1955-5p	1851.7	791.5	0.4	mmu-miR-2134	120.3	1.0	0.01
mmu-miR-664-3p	964.4	381.1	0.4	mmu-miR-1949	124.0	1.0	0.01
mmu-miR-380-3p	61.3	1.0	0.02				
mmu-miR-539-5p	61.3	1.0	0.02				
mmu-miR-467c-5p	62.8	1.0	0.02				
mmu-miR-1193-3p	66.0	1.0	0.02				
mmu-miR-199a-3p	73.8	1.0	0.01				
mmu-miR-383-5p	75.4	1.0	0.01				
mmu-miR-489-3p	92.7	1.0	0.01				
mmu-miR-1953	97.4	1.0	0.01				
mmu-miR-743a-3p	125.6	1.0	0.01				
mmu-miR-410-3p	130.4	1.0	0.01				
mmu-miR-1933-5p	207.3	1.0	0.005				

FC- Veces de cambios

10.9 microRNA CON MAYOR Y MENOR ACUMULACIÓN EN M_{TCEs+LPS}

4 h posestímulo				24 h posestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado a M ₀)	
microRNA	M ₀	M _{TCEs+LPS}	M _{TCEs+LPS}	microRNA	M ₀	M _{TCEs+LPS}	M _{TCEs+LPS}
mmu-miR-155-5p	1.0	676.2	676.2	mmu-miR-155-5p	1.0	4272.7	4272.7
mmu-miR-546	1.0	112.8	112.8	mmu-miR-210-3p	1.0	285.4	285.4
mmu-miR-128-3p	1.00	88.90	88.90	mmu-miR-674-5p	1.0	171.6	171.6
mmu-miR-421-3p	1.0	84.3	84.3	mmu-miR-331-3p	1.0	127.7	127.7
mmu-miR-331-3p	1.0	74.1	74.1	mmu-miR-7a-5p	1.0	109.8	109.8
mmu-miR-484	130.36	341.63	2.62	mmu-miR-574-3p	1.0	96.8	96.8
mmu-miR-191-5p	281.14	690.69	2.46	mmu-miR-467a-5p	1.0	92.8	92.8
mmu-miR-30b-5p	763.32	1864.64	2.44	mmu-miR-1929-5p	1.0	88.8	88.8
mmu-miR-99b-5p	61.3	147.0	2.4	mmu-miR-489-3p	1.0	87.8	87.8
mmu-miR-148b-3p	155.49	360.16	2.32	mmu-miR-139-5p	1.0	83.8	83.8
mmu-miR-221-3p	1821.9	4164.7	2.3	mmu-miR-539-5p	1.0	81.8	81.8
mmu-miR-146a-5p	2586.8	5369.4	2.1	mmu-miR-1839-3p	1.0	81.8	81.8
mmu-miR-103-3p	406.79	840.00	2.06	mmu-miR-362-5p	1.0	80.8	80.8
mmu-miR-24-3p	1597.3	3280.2	2.1	mmu-miR-200b-3p	1.0	79.8	79.8
mmu-miR-29b-3p	2831.8	5796.8	2.0	mmu-miR-125a-5p	588.1	4260.9	7.2
				mmu-miR-1902	545.9	2486.7	4.6
				mmu-miR-146a-5p	4196.8	17577.3	4.2
				mmu-miR-101b-3p	175.7	721.5	4.1
				mmu-miR-222-3p	682.1	2609.4	3.8
				mmu-miR-99b-5p	143.7	535.9	3.7
				mmu-let-7e-5p	532.7	1374.1	2.6
				mmu-miR-377-3p	75.2	193.6	2.6
				mmu-miR-30e-5p	96.8	236.5	2.4
				mmu-miR-376a-3p	300.6	705.5	2.3
				mmu-miR-484	178.5	413.3	2.3
				mmu-let-7i-5p	4784.0	10898.6	2.3
				mmu-miR-30d-5p	600.3	1352.1	2.3
				mmu-miR-467f	85.5	179.6	2.1

microRNA disminuidos en M_{TCEs+LPS}

4 h posestímulo				24 h posestímulo			
Cuentas normalizadas		FC (comparado con M ₀)		Cuentas normalizadas		FC (comparado a M ₀)	
microRNA	M ₀	M _{TCEs+LPS}	M _{TCEs+LPS}	microRNA	M ₀	M _{TCEs+LPS}	M _{TCEs+LPS}
mmu-miR-190b-5p	1909.9	934.6	0.5	mmu-miR-326-3p	286.5	137.7	0.48
mmu-miR-1955-5p	1851.7	870.8	0.5	mmu-miR-361-5p	291.2	97.8	0.34
mmu-miR-1933-5p	207.3	84.3	0.4	mmu-miR-27a-3p	10683.1	3369.8	0.32
mmu-miR-125a-3p	300.0	108.3	0.4	mmu-miR-221-3p	2241.7	657.6	0.29
mmu-miR-664-3p	964.4	339.6	0.4	mmu-miR-23a-3p	9293.6	2421.8	0.26
mmu-miR-1224-5p	1674.3	577.9	0.3	mmu-miR-27b-3p	732.8	188.6	0.26
mmu-miR-1193-3p	66.0	1.0	0.02	mmu-miR-762	701.8	158.7	0.23
mmu-miR-2137	102.1	1.0	0.01	mmu-miR-1224-5p	1633.8	363.2	0.22
mmu-miR-210-3p	105.2	1.0	0.01	mmu-miR-199a-3p	74.2	1.0	0.01
mmu-miR-804	130.4	1.0	0.01	mmu-miR-145-5p	95.8	1.0	0.01
				mmu-miR-208b-3p	96.8	1.0	0.01
				mmu-miR-743b-5p	98.6	1.0	0.01
				mmu-miR-742-3p	101.5	1.0	0.01
				mmu-miR-872-5p	105.2	1.0	0.01
				mmu-miR-2134	120.3	1.0	0.01
				mmu-miR-1949	124.0	1.0	0.01

mmu-miR-2137	146.6	1.0	0.01
mmu-miR-714	205.8	1.0	0.00
mmu-miR-2133	223.6	1.0	0.004

FC-Veces de cambios

10.10 microRNA PRODUCIDOS DIFERENCIALMENTE ENTRE M_{TcES+LPS} Y M_{LPS}

4 h postestímulo						24 h postestímulo					
microRNA	Cuentas normalizadas			FC (comparado con M ₀)		microRNA	Cuentas normalizadas			FC (comparado con M ₀)	
	M ₀	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}		M ₀	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}	M _{TcES+LPS}	M _{LPS}
mmu-miR-128-3p	1.0	88.9	1	88.9	1.0	mmu-miR-1933-5p	1.0	1.0	901.4	1.0	901.4
mmu-miR-331-3p	1.0	74.1	1	74.1	1.0	mmu-miR-673-3p	1.0	1.0	518.4	1.0	518.4
mmu-miR-421-3p	1.0	84.3	1	84.3	1.0	mmu-miR-466a-5p	1.0	1.0	308.2	1.0	308.2
mmu-miR-484	130.4	341.6	157.0	2.6	1.2	mmu-miR-1900	1.0	1.0	261.5	1.0	261.5
mmu-miR-103-3p	406.8	840.0	613.3	2.1	1.5	mmu-miR-1953	1.0	1.0	242.9	1.0	242.9
mmu-miR-24-3p	1597.3	3280.2	2588.2	2.1	1.6	mmu-miR-743a-3p	1.0	1.0	238.2	1.0	238.2
mmu-miR-99b-5p	61.3	147.0	106.3	2.4	1.7	mmu-miR-1982-3p	1.0	1.0	238.2	1.0	238.2
mmu-miR-221-3p	1821.9	4164.7	3231.2	2.3	1.8	mmu-miR-410-3p	1.0	1.0	233.5	1.0	233.5
mmu-miR-191-5p	281.1	690.7	505.8	2.5	1.8	mmu-miR-3474	1.0	1.0	219.5	1.0	219.5
mmu-miR-30b-5p	763.3	1864.6	1377.6	2.4	1.8	mmu-miR-876-5p	1.0	1.0	186.8	1.0	186.8
mmu-miR-148b-3p	155.5	360.2	283.2	2.3	1.8	mmu-miR-544-3p	1.0	1.0	158.8	1.0	158.8
mmu-miR-29b-3p	2831.8	5796.8	5220.9	2.0	1.8	mmu-miR-344-3p	1.0	1.0	154.1	1.0	154.1
mmu-miR-1193-3p	66.0	1.0	76.7	0.02	1.2	mmu-miR-467c-5p	1.0	1.0	154.1	1.0	154.1
mmu-miR-664-3p	964.4	339.6	541.6	0.4	0.6	mmu-miR-882	1.0	1.0	149.4	1.0	149.4
mmu-miR-1933-5p	207.3	84.3	117.5	0.4	0.6	mmu-miR-1936	1.0	1.0	149.4	1.0	149.4
mmu-miR-1955-5p	1851.7	870.8	1169.8	0.5	0.6	mmu-miR-139-3p	1.0	1.0	144.8	1.0	144.8
mmu-miR-190b-5p	1909.9	934.6	1304.6	0.5	0.7	mmu-miR-501-3p	1.0	1.0	140.1	1.0	140.1
mmu-miR-210-3p	105.2	1.0	97.7	0.01	0.9	mmu-miR-712-5p	1.0	1.0	140.1	1.0	140.1
mmu-miR-489-3p	92.7	75.2	1.0	0.8	0.01	mmu-miR-141-3p	1.0	1.0	135.4	1.0	135.4
mmu-miR-714	66.0	85.5	1.0	1.3	0.02	mmu-miR-367-3p	1.0	1.0	135.4	1.0	135.4
mmu-miR-467c-5p	62.824	74.08426	1	1.2	0.016	mmu-miR-1193-3p	1.0	1.0	135.4	1.0	135.4
mmu-miR-380-3p	61.254	71.80474	1	1.2	0.016	mmu-miR-298-5p	1.0	1.0	130.8	1.0	130.8
mmu-miR-467f	61.254	76.36377	1	1.2	0.016	mmu-miR-495-3p	1.0	1.0	130.8	1.0	130.8
mmu-miR-539-5p	61.254	72.9445	1	1.2	0.016	mmu-miR-380-3p	1.0	1.0	126.1	1.0	126.1
mmu-miR-762	350.25	227.9516	155.81	0.7	0.445	mmu-miR-100-5p	1.0	1.0	121.4	1.0	121.4
						mmu-miR-411-5p	1.0	1.0	121.4	1.0	121.4
						mmu-miR-547-3p	1.0	1.0	121.4	1.0	121.4
						mmu-miR-764-5p	1.0	1.0	121.4	1.0	121.4
						mmu-miR-1892	1.0	1.0	121.4	1.0	121.4
						mmu-miR-335-3p	1.0	1.0	116.8	1.0	116.8
						mmu-miR-568	1.0	1.0	116.8	1.0	116.8
						mmu-miR-691	385.2	305.3	4371.3	0.8	11.3
						mmu-miR-1955-5p	621.0	460.0	5800.4	0.7	9.3
						mmu-miR-190b-5p	680.2	611.7	6314.1	0.9	9.3
						mmu-miR-2183	166.3	322.3	1331.0	1.9	8.0
						mmu-miR-1951	469.8	352.2	3680.1	0.7	7.8
						mmu-miR-664-3p	168.2	132.7	1162.9	0.8	6.9
						mmu-miR-195-5p	126.8	91.8	635.1	0.7	5.0
						mmu-miR-742-3p	101.5	1.0	495.0	0.01	4.9
						mmu-miR-743b-5p	98.6	1.0	457.7	0.01	4.6
						mmu-miR-1981-5p	188.8	153.7	854.6	0.8	4.5
						mmu-miR-193b-3p	701.8	503.9	3152.4	0.7	4.5
						mmu-miR-466g	129.7	168.6	574.4	1.3	4.4
						mmu-miR-3471	210.4	140.7	887.3	0.7	4.2
						mmu-miR-136-5p	145.6	266.4	597.8	1.8	4.1
						mmu-miR-496a-3p	142.8	79.8	574.4	0.6	4.0
						mmu-miR-30a-5p	211.4	364.2	840.6	1.7	4.0
						mmu-miR-741-3p	656.7	373.2	2433.2	0.6	3.7
						mmu-miR-1949	124.0	1.0	439.0	0.01	3.5

mmu-miR-297c-5p	100.5	143.7	345.6	1.4	3.4
mmu-miR-188-5p	384.3	398.1	1232.9	1.0	3.2
mmu-let-7a-5p	6897.3	7277.0	20815.9	1.1	3.0
mmu-miR-22-3p	21580.5	23939.6	64187.4	1.1	3.0
mmu-miR-154-5p	559.9	598.7	1601.9	1.1	2.9
mmu-miR-99a-5p	1065.4	1541.7	3031.0	1.4	2.8
mmu-miR-130a-3p	124.0	131.7	340.9	1.1	2.7
mmu-miR-374b-5p	155.0	205.6	415.6	1.3	2.7
mmu-miR-130b-3p	296.9	384.2	765.9	1.3	2.6
mmu-miR-98-5p	507.3	510.9	1251.6	1.0	2.5
mmu-miR-328-3p	118.4	93.8	284.9	0.8	2.4
mmu-miR-1839-5p	134.3	128.7	312.9	1.0	2.3
mmu-miR-101a-3p	379.6	383.2	868.7	1.0	2.3
mmu-let-7f-5p	5009.4	5752.7	11325.3	1.1	2.3
mmu-let-7c-5p	3099.4	3166.2	6888.6	1.0	2.2
mmu-miR-652-3p	251.8	350.2	546.4	1.4	2.2
mmu-miR-378-3p	510.2	574.8	1078.8	1.1	2.1
mmu-miR-21a-5p	23295.1	32629.0	48957.9	1.4	2.1
mmu-miR-199a-3p	74.2	1.0	154.1	0.01	2.1
mmu-miR-146a-5p	4196.8	17577.3	8224.3	4.2	2.0
mmu-miR-467f	85.5	179.6	149.4	2.1	1.7
mmu-miR-2134	120.3	1.0	154.1	0.01	1.3
mmu-miR-30d-5p	600.3	1352.1	672.5	2.3	1.1
mmu-miR-872-5p	105.2	1.0	116.8	0.01	1.1
mmu-miR-139-5p	1.0	83.8	1.0	83.8	1.0
mmu-miR-331-3p	1.0	127.7	1.0	127.7	1.0
mmu-miR-361-5p	291.2	97.8	261.5	0.3	0.9
mmu-miR-2133	223.6	1.0	144.8	0.004	0.6
mmu-miR-326-3p	286.5	137.7	182.1	0.5	0.6
mmu-miR-338-3p	262.1	267.4	126.1	1.0	0.5
mmu-miR-301a-3p	502.6	349.3	214.8	0.7	0.4
mmu-miR-103-3p	801.4	731.4	238.2	0.9	0.3
mmu-miR-24-3p	3130.4	2792.0	471.7	0.9	0.2
mmu-miR-15b-5p	2720.8	3039.5	368.9	1.1	0.1
mmu-miR-29b-3p	6290.0	5942.2	695.9	0.9	0.1
mmu-miR-340-3p	101.5	122.7	1.0	1.2	0.01
mmu-miR-365-3p	114.6	126.7	1.0	1.1	0.01
mmu-miR-423-3p	116.5	104.8	1.0	0.9	0.01
mmu-miR-1983	127.8	122.7	1.0	1.0	0.01
mmu-miR-185-5p	136.2	135.7	1.0	1.0	0.01
mmu-miR-362-3p	148.4	147.7	1.0	1.0	0.01
mmu-miR-484	178.5	413.3	1.0	2.3	0.01
mmu-miR-152-3p	186.0	180.6	1.0	1.0	0.01
mmu-miR-107-3p	232.1	194.6	1.0	0.8	0.004
mmu-miR-324-5p	248.0	181.6	1.0	0.7	0.004
mmu-miR-148b-3p	368.3	417.1	1.0	1.1	0.003
mmu-miR-350-3p	637.0	605.7	1.0	1.0	0.002

FC-Veces de cambios

10.11 ANÁLISIS DE VÍAS KEGG

4 h posestímulo								
M _{TcES}			M _{TcES+LPS}			M _{LPS}		
Vías KEGG	p-value	#genes	Vías KEGG	p-value	#genes	Vías KEGG	p-value	#genes
Glioma	0.001	32	Ubiquitin mediated proteolysis	0.002	70	Prostate cancer	0.015	27
TGF-beta signaling pathway	0.001	38	p53 signaling pathway	0.003	35	Steroid biosynthesis	0.016	6
Chronic myeloid leukemia	0.001	38	GnRH signaling pathway	0.003	44	FoxO signaling pathway	0.018	36
Insulin signaling pathway	0.001	68	T cell receptor signaling pathway	0.004	51	Acute myeloid leukemia	0.019	17
HIF-1 signaling pathway	0.003	53	Focal adhesion	0.005	90	Thyroid hormone synthesis	0.019	15
Prostate cancer	0.003	46	Insulin signaling pathway	0.005	65	HTLV-I infection	0.020	60
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	0.004	28	TNF signaling pathway	0.006	47	Glioma	0.020	17
ECM-receptor interaction	0.004	31	TGF-beta signaling pathway	0.006	35	Chronic myeloid leukemia	0.040	22
Inositol phosphate metabolism	0.005	28	Peroxisome	0.009	41			
Valine, leucine and isoleucine degradation	0.005	22	Inositol phosphate metabolism	0.010	26			
Colorectal cancer	0.006	31	Prostate cancer	0.010	44			
Hepatitis B	0.007	56	HTLV-I infection	0.010	112			
Thyroid hormone signaling pathway	0.007	54	Pancreatic cancer	0.012	33			
HTLV-I infection	0.007	111	HIF-1 signaling pathway	0.014	51			
Viral carcinogenesis	0.008	90	Hepatitis B	0.014	57			
MAPK signaling pathway	0.011	102	Phosphatidylinositol signaling system	0.015	37			
Acute myeloid leukemia	0.012	28	Glioma	0.015	29			
AMPK signaling pathway	0.016	58	Citrate cycle	0.017	16			
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.018	14	Thyroid hormone synthesis	0.018	30			
Pancreatic cancer	0.022	32	Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate	0.022	8			
Progesterone-mediated oocyte maturation	0.024	41	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.022	41			
Chagas disease	0.026	42	Chagas disease	0.023	44			
Lysosome	0.027	53	Viral carcinogenesis	0.023	85			
Estrogen signaling pathway	0.030	41	Notch signaling pathway	0.027	25			
2-Oxocarboxylic acid metabolism	0.038	10	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	0.027	24			
Citrate cycle	0.038	17	ECM-receptor interaction	0.032	31			
Circadian rhythm	0.039	16	Colorectal cancer	0.032	29			
Axon guidance	0.039	54	Axon guidance	0.035	53			
Glycosaminoglycan biosynthesis-chondroitin sulfate	0.041	9	Acute myeloid leukemia	0.037	25			
T cell receptor signaling pathway	0.046	46	PI3K-Akt signaling pathway	0.037	132			
Endometrial cancer	0.047	26	Estrogen signaling pathway	0.037	40			

GnRH signaling pathway	0.050	39	MAPK signaling pathway	0.044	97
------------------------	-------	----	------------------------	-------	----

24 h posestimulo

M _{TcES}	M _{TcES+LPS}			M _{LPS}		
	KEGG pathway	p-value	#genes	KEGG pathway	p-value	#genes
	Axon guidance	0.0030	57	Inositol phosphate metabolism	0.0006	38
	Insulin signaling pathway	0.0030	66	Pathways in cancer	0.0010	208
	HTLV-I infection	0.0032	112	Insulin signaling pathway	0.0010	85
	Neurotrophin signaling pathway	0.0034	56	Long-term depression	0.0011	35
	ErbB signaling pathway	0.0038	43	Axon guidance	0.0011	76
	Lysosome	0.0039	54	AMPK signaling pathway	0.0013	80
	Glioma	0.0052	30	Cell cycle	0.0014	71
	Osteoclast differentiation	0.0056	57	T cell receptor signaling pathway	0.0016	64
	Ubiquitin mediated proteolysis	0.0060	68	mTOR signaling pathway	0.0016	41
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.0063	15	TNF signaling pathway	0.0021	61
	Circadian rhythm	0.0071	18	HIF-1 signaling pathway	0.0023	67
	N-Glycan biosynthesis	0.0074	20	Pancreatic cancer	0.0028	42
	Viral carcinogénesis	0.0084	88	N-Glycan biosynthesis	0.0029	27
	Focal adhesión	0.0128	87	Citrate cycle (TCA cycle)	0.0039	22
	Prostate cancer	0.0154	43	Prostate cancer	0.0044	54
	Cell cycle	0.0194	52	Propanoate metabolism	0.0055	18
	TNF signaling pathway	0.0198	47	Valine, leucine and isoleucine degradation	0.0055	32
	mTOR signaling pathway	0.0211	30	Phosphatidylinositol signaling system	0.0055	50
	Central carbon metabolism in cancer	0.0211	27	TGF-beta signaling pathway	0.0064	45
	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0218	44	Regulation of actin cytoskeleton	0.0097	114
	Chronic myeloid leukemia	0.0218	35	Chronic myeloid leukemia	0.0097	45
	Dorso-ventral axis formation	0.0223	15	SNARE interactions in vesicular transport	0.0099	20
	Adipocytokine signaling pathway	0.0233	32	Circadian rhythm	0.0103	21
	TGF-beta signaling pathway	0.0233	35	Vitamin B6 metabolism	0.0106	6
	Gap junction	0.0239	37	Ubiquitin mediated proteolysis	0.0106	85
	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	0.0243	9	Sphingolipid signaling pathway	0.0106	72
	Steroid biosynthesis	0.0243	9	Lysosome	0.0133	66
	Vitamin B6 metabolism	0.0280	5	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.0137	38
	Phosphatidylinositol signaling system	0.0295	37	ErbB signaling pathway	0.0180	51
	Citrate cycle (TCA cycle)	0.0303	16	Transcriptional misregulation in cancer	0.0184	90
	Oocyte meiosis	0.0378	46	Wnt signaling pathway	0.0184	75
	Prolactin signaling pathway	0.0401	34	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.0190	75
	GnRH signaling pathway	0.0419	39	Central carbon metabolism in cancer	0.0210	35
	Inositol phosphate metabolism	0.0427	25	GnRH signaling pathway	0.0210	51
	Galactose metabolism	0.0432	13	Glioma	0.0210	36
	Thyroid cancer	0.0432	14	HTLV-I infection	0.0210	140
	Wnt signaling pathway	0.0432	59	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	0.0210	81
	Pancreatic cancer	0.0473	31	Osteoclast differentiation	0.0249	68
	Cysteine and methionine metabolism	0.0494	17	Adipocytokine signaling pathway	0.0261	40
	Small cell lung cancer	0.0494	37	Bacterial invasion of epithelial cells	0.0261	44
				mRNA surveillance pathway	0.0261	57
				Focal adhesión	0.0272	109
				Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	0.0303	12
				Small cell lung cancer	0.0336	48
				Estrogen signaling pathway	0.0410	53
				Long-term potentiation	0.0434	39
				Spliceosome	0.0452	76
				Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0.0459	16

	Pyruvate metabolism	0.0490	23
	Oxytocin signaling pathway	0.0490	83

10.12 PROCESOS BIOLÓGICOS DE TÉRMINOS GO

4 h posestímulos					
M _{TcES}		M _{TcES+LPS}		M _{LPS}	
Categoría GO: Procesos biológicos	#genes	Categoría GO: Procesos biológicos	#genes	Categoría GO: Procesos biológicos	#genes
anatomical structure development	1290	anatomical structure development	1253	chromosome organization	148
cell differentiation	908	cell differentiation	900	biosynthetic process	630
embryo development	382	embryo development	390	protein complex	614
cellular protein modification process	871	cellular protein modification process	845	cell cycle	217
cellular nitrogen compound metabolic process	1456	cellular nitrogen compound metabolic process	1444	cell division	121
biosynthetic process	1291	biosynthetic process	1251	catabolic process	323
chromosome organization	259	chromosome organization	255	anatomical structure formation involved in morphogenesis	140
anatomical structure formation involved in morphogenesis	291	anatomical structure formation involved in morphogenesis	291	cell morphogenesis	122
homeostatic process	332	catabolic process	601	cell death	169
catabolic process	621	cell morphogenesis	231	chromosome	134
cytoskeleton organization	273	cell cycle	369	homeostatic process	153
cell morphogenesis	231	homeostatic process	304	cytoskeleton organization	133
cell cycle	372	cell división	194	nuclear chromosome	55
cell division	195	cell death	305	nucleic acid binding transcription factor activity	164
cell death	315	cytoskeleton organization	251	nucleoplasm	192
growth	165	growth	160	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	98
cell motility	209	cell motility	200	response to stress	326
response to stress	666	response to stress	644	enzyme binding	193
cellular component assembly	380	cellular component assembly	365	protein binding transcription factor activity	82
developmental maturation	59	small molecule metabolic process	605	immune system process	240
in utero embryonic development	142	developmental maturation	57	cellular component assembly	189
small molecule metabolic process	617	in utero embryonic development	138	growth	77
DNA metabolic process	227	circulatory system process	58	in utero embryonic development	76
circulatory system process	56	DNA metabolic process	221	small conjugating protein binding	26
vesicle-mediated transport	301	immune system process	425	endosome	120
cofactor metabolic process	76	nucleobase-containing compound catabolic process	228	cytoskeleton	230
immune system process	429	ribonucleoprotein complex assembly	50	developmental maturation	32
cell junction organization	48	cell proliferation	189	cell motility	95
cell proliferation	195	protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	41	DNA metabolic process	116
protein targeting	87			vesicle-mediated transport	159
				ligase activity	107
				cytoplasmic vesicle	77
				Golgi apparatus	233
				ubiquitin-protein transferase activity	96
				ubiquitin protein ligase binding	61
				endoplasmic reticulum	249
				small molecule metabolic process	283

	cytoskeletal protein binding	107
	poly(A) RNA binding	250
	protein ubiquitination	95
	PML body	28
	negative regulation of transcription, DNA-templated	130
	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	17
	transcription, DNA-templated	348
	transcriptional repressor complex	23
	nucleobase-containing compound catabolic process	115
	protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	24
	circulatory system process	27
	protein polyubiquitination	31
	protein kinase binding	96
	ribonucleoprotein complex assembly	26
	transcription factor binding	97
	proline-rich region binding	11
	cell junction organization	25

24 h posestímulo

M _{TcES}		M _{TcES+LPS}		M _{LPS}	
Categoría GO: Procesos biológicos	#genes	Categoría GO: Procesos biológicos	#genes	Categoría GO: Procesos biológicos	#genes
anatomical structure development	198	cell	4177	cell	5903
cell differentiation	138	intracellular	3800	intracellular	5354
chromosome organization	52	organelle	3229	organelle	4527
embryo development	65	anatomical structure development	1290	anatomical structure development	1773
cellular nitrogen compound metabolic process	212	cell differentiation	947	cell differentiation	1290
biosynthetic process	190	ion binding	1963	ion binding	2704
cellular protein modification process	119	embryo development	402	embryo development	520
catabolic process	99	cytoplasm	3130	cytoplasm	4377
cell morphogenesis	41	cellular protein modification process	847	cellular protein modification process	1120
cell motility	41	chromosome organization	251	chromosome organization	328
growth	32	cellular nitrogen compound metabolic process	1353	cellular nitrogen compound metabolic process	1875
anatomical structure formation involved in morphogenesis	43	biosynthetic process	1208	anatomical structure formation involved in morphogenesis	411
in utero embryonic development	29	anatomical structure formation involved in morphogenesis	295	biosynthetic process	1646
cytoskeleton organization	41	cell morphogenesis	254	cell morphogenesis	352
cell cycle	55	homeostatic process	324	protein complex	1657
cell division	31	protein complex	1159	homeostatic process	435
chromosome segregation	18	catabolic process	576	cytoskeleton organization	368
cellular component assembly	62	cell cycle	356	cytoskeleton	715
negative regulation of translation	11	cytoskeleton	503	cell division	271
positive regulation of mitotic cell cycle	8	cell división	191	cell cycle	486
		cytoskeleton organization	250	cell death	409

cell motility	207	catabolic process	763
cell death	292	nuclear chromosome	127
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	186	developmental maturation	88
growth	155	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	251
endosome	241	cellular component assembly	528
cellular component assembly	377	cell motility	267
cytoskeletal protein binding	243	chromosome	301
response to stress	636	cytoskeletal protein binding	330
in utero embryonic development	147	growth	199
protein binding transcription factor activity	153	nucleic acid binding transcription factor activity	387
developmental maturation	61	response to stress	858
nuclear chromosome	85	vacuole	149
endoplasmic reticulum	532	in utero embryonic development	183
nucleic acid binding transcription factor activity	282	endosome	304
vacuole	112	protein binding transcription factor activity	192
small molecule metabolic process	596	endoplasmic reticulum	717
enzyme binding	356	circulatory system process	77
chromosome	206	nucleoplasm	443
nucleoplasm	331	enzyme regulator activity	320
enzyme regulator activity	232	cofactor metabolic process	106
Golgi apparatus	465	small molecule metabolic process	791
ligase activity	197	cytoskeleton-dependent intracellular transport	54
cytoskeleton-dependent intracellular transport	41	Golgi apparatus	638
vesicle-mediated transport	296	enzyme binding	460
immune system process	422	membrane organization	201
cofactor metabolic process	76	DNA metabolic process	283
macromolecular complex assembly	222	macromolecular complex assembly	305
circulatory system process	50	mitochondrion organization	107
small conjugating protein binding	32	ligase activity	257
cell proliferation	189	vesicle-mediated transport	393
mitochondrion organization	77	translation factor activity, nucleic acid binding	50
nucleobase-containing compound catabolic process	219	plasma membrane organization	56
protein targeting	81	small conjugating protein binding	39
cytoplasmic vesicle	130		