



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**La función del factor de transcripción STAT3 en la expresión del  
gene de Interleucina-10 en macrófagos humanos infectados con  
*Mycobacterium bovis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Edgardo Madrid Paulino

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva  
(Instituto de Biotecnología-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Viviana Valadez Graham (Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz (Facultad de Medicina UAEM)

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Comité Jurado

Dra. Susana López Charretón

Dra. Angélica Santana Calderón

Dra. Judith González Christen

Dr. Víctor H. Bustamante Santillán

Dr. Adrián Ochoa Leyva

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca Morelos), bajo la tutoría del Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento de ICEGEB/Italia (CRP-MEX11-01)

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo y que me han acompañado a lo largo del camino.

Al Dr. Gustavo Pedraza y a la Dra. Leonor Pérez por permitirme ser parte de su laboratorio. A la Dra. Viviana Valadez y al Dr. Mario Cruz por sus comentarios y sugerencias que fueron valiosos para el desarrollo de este proyecto. A los miembros del comité jurado: Dra. Susana López, Dra. Judith Gonzales, Dr. Víctor Bustamante, Dra. Angélica Santana y al Dr. Adrián Ochoa, por sus aportaciones para mejorar la calidad de este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio, Rafa, Sol, Oswaldo, Angélica por su ayuda directa para la elaboración de este proyecto. Además quisiera hacer un agradecimiento muy especial al Dr. Tomas Villaseñor por su gran ayuda, consejo y amistad brindados a lo largo de todo este trabajo. Y en general a los demás miembros del NIB (Jonh, Jime, Cesar, Alonso, Toño, Erick, Nilda, Martha, Roberto, Tonalí, Alex) por haber hecho que mi estancia en NIB fuera agradable.

A mi familia, por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de todos estos años muy en especial a mis padres, por haberme brindado todas las oportunidades, apoyo y por alentarme siempre a continuar con mis sueños. A mi hermana y a Edgar por su comprensión y cariño y finalmente a Ayleen por que con su sonrisa me motivaba cada día.

A Gilda por todo su cariño, paciencia y apoyo brindados, además de ser una inspiración y retarme académica e intelectualmente lo cual me permitió madurar como estudiante, científico y persona, por lo cual le estaré siempre agradecido.

A Rafa, Oski, Cesar, Panchito, Bacho Friends, pandas, venados y todas las personas que me han brindado de su amistad a lo largo de estos años.

Al programa de apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico brindado para este proyecto.

Y muy especial a Gustavo por haber confiado en mi persona, por su paciencia y guía a lo largo de este trabajo. Por su apoyo y enseñanza que me han permitido crecer como científico y como persona.

A todos ellos muchas gracias.

## Contenido

RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
TUBERCULOSIS.....	10
TUBERCULOSIS MULTIDROGO-RESISTENTE.....	11
ANTECEDENTES.....	12
EL SISTEMA INMUNE JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN EL CONTROL DE INFECCIONES.....	12
INFECCIÓN DEL MACRÓFAGO POR MYCOBACTERIUM.....	14
<i>M. TUBERCULOSIS</i> Y <i>M. BOVIS</i> BCG.....	16
EL GRANULOMA.....	17
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-10 EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON Mtb.....	18
STAT3.....	19
STAT3 REGULA LA EXPRESIÓN DE IL-10.....	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
METODOLOGÍA.....	22
CULTIVO CELULAR.....	22
DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS THP-1.....	22
ACTIVACIÓN CELULAR.....	23
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	23
WESTERN BLOT.....	24
TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	24
DISEÑO DE VECTORES STAT3-TK-LUC Y STAT3mut-TK-LUC.....	25

DISEÑO DE VECTORES PGL3-PIL10 Y PGL3-PIL10mut.....	26
MUTAGÉNESIS.....	28
OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN DE CELULAS THP-1.....	29
TRANSFECCIÓN Y ACTIVACIÓN.....	30
ENSAYO DE ELISA (ENZYME- LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY POR SUS SIGLAS EN INGLÉS).....	30
ANALISIS DE CUANTIFICACION POR DENSITOMETRIA.....	30
ESTADISTICA.....	31
RESULTADOS.....	31
LA INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON <i>M. BOVIS</i> INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE STAT3.....	31
<i>M. BOVIS</i> BCG INDUCE LA TRASCRIPTIÓN MEDIADA POR STAT3.....	32
STAT3 INDUCE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON <i>M. BOVIS</i> BCG.....	33
.....	33
JAK Y SYK SON NECESARIOS PARA INDUCIR LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR STAT3.....	34
JAK Y SYK INDUCEN LA EXPRESION DE IL-10 A TRAVES DE STAT3 EN CÉLULAS THP-1 INFECTADAS CON <i>M. BOVIS</i> .....	35
.....	37
<i>M. BOVIS</i> BCG INDUCE LA SECRECIÓN DE IL-10 EN CELULAS THP-1 DE MANERA DEPENDIENTE DE LA VÍA DE SYK.....	37
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIÓN.....	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXO.....	49
ESTANDARIZACIÓN DE TRANSFECCION DE CÉLULAS THP-1 Y RAW BLUE.....	51
APÉNDICE.....	55

Abreviaturas.....57



## RESUMEN

Han pasado 132 años desde que Roberto Koch descubrió el agente causal de la tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) la cual, es una bacteria Gram-positiva, estrictamente aeróbica, de crecimiento lento y capaz de sobrevivir intracelularmente en macrófagos. Actualmente este patógeno continúa siendo un problema de salud a nivel mundial, ya que se ha incrementado su propagación en individuos que presentan alguna inmunodeficiencia y también por el surgimiento de cepas multi-resistentes. Se estima que, alrededor de un tercio de la población mundial se encuentra infectada con Mtb, causando 1.5 millones de muertes anualmente. Generalmente, la respuesta inmune que se genera en contra del bacilo es suficiente para evitar el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, en la mayoría de los casos, la completa destrucción del patógeno no se logra de manera exitosa. Los macrófagos contribuyen a la eliminación de los bacilos a través de diversos mecanismos, incluyendo la acidificación y maduración del fagosoma. Sin embargo, Mtb asegura su propia sobrevivencia dentro del macrófago, inhibiendo la maduración del fagolisosoma. A pesar de que los linfocitos T juegan un papel muy importante en contra de la infección de Mtb al producir  $INF\gamma$ , el bacilo promueve la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y  $TGF\beta$ , las cuales inhiben la producción y función de  $INF\gamma$  y  $TNF\alpha$ , de esta forma se altera la respuesta inmune, permitiendo una infección exitosa. Lamentablemente se conoce muy poco acerca de las vías de señalización que activa Mtb para promover la expresión de IL-10 y  $TGF\beta$  en macrófagos, no obstante, datos recientes han demostrado que el receptor MinCLE activa una vía de señalización en la cual la fosforilación de la cinasa SYK, promueve la expresión de IL-10 en macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*. Por otra parte se ha reportado que SYK es capaz de fosforilar al factor de transcripción STAT3, induciendo su actividad como factor transcripcional. En este trabajo nosotros encontramos que al infectar células THP-1 con *M. bovis* BCG se induce la expresión de IL-10 a través de la activación de STAT3 la cual es activada por la cinasa SYK, explicando así la posible vía de activación de la IL-10 a nivel molecular.

## ABSTRACT

It has been 132 years since Roberto Koch discovered the bacillus causing tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Mtb is a Gram-positive bacterium, strictly aerobic, slow growing, able to survive within macrophages. This pathogen is still a serious health problem world-wide because of its increased propagation among individuals with acquired immunodeficiency syndrome and the appearance of drug resistant strains. It is well known that over one third of the global population is estimated to be infected with Mtb, causing almost two million deaths annually (according to the World Health Organization). In most cases, the immune response against Mtb is sufficient to avoid developing active disease; however, complete destruction of the pathogen is frequently not achieved. Macrophages contribute to the elimination of bacilli via numerous mechanisms, including the successful acidification and maturation of phagosomes. However, Mtb ensures its survival within host macrophages by arresting the maturation pathway that leads to phagosome–lysosome fusion. Although it is well known that  $\text{INF}\gamma$  produced by T lymphocytes plays a key role against Mtb infection, Mtb promotes the expression of cytokines IL-10 and  $\text{TGF}\beta$  that antagonize  $\text{INF}\gamma$  production and functions, thus altering the normal immune response allowing successful infection. The signal transduction pathways activated by Mtb leading to IL-10 and  $\text{TGF}\beta$  expression in macrophages, are poorly understood. However, recently it has been shown that Mincle activates a signaling pathway involving tyrosine kinase SYK leading to IL-10 expression in macrophages; in addition, it has been reported that SYK phosphorylates and thus activates the transcription factor STAT3 promoting its transcriptional activity. In this work we found that *M. bovis* BCG induces the expression of IL-10 in macrophages by activated STAT3 through SYK.

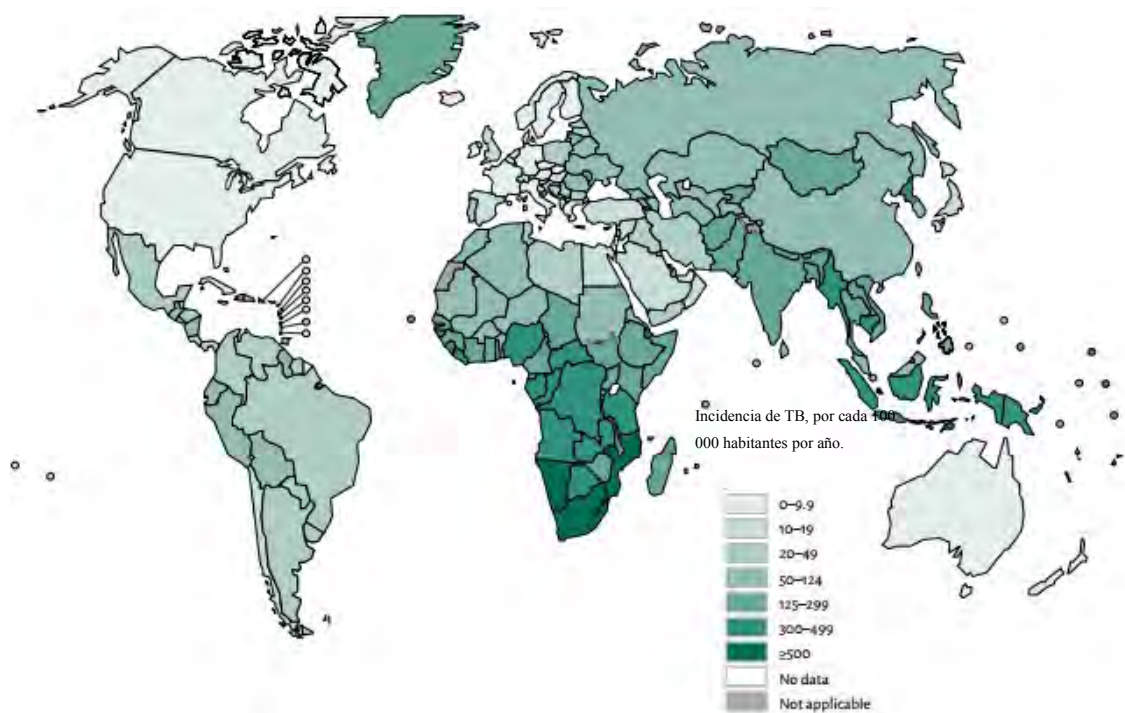
# INTRODUCCIÓN.

## TUBERCULOSIS.

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) o bacilo de Koch es una bacteria Gram positiva, aeróbica estricta, de crecimiento lento, capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos (Macs) (Madigan, et al., 2009). Esta bacteria es el agente causal de la tuberculosis (TB). La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que generalmente afecta a los pulmones pero también puede afectar otros órganos. Se puede transmitir en forma aérea de una persona a otra a través de la expulsión de aerosoles contaminados con el patógeno, por medio de la saliva, al estornudar o al toser. La infección por Mtb suele ser asintomática en personas sanas, ya que el sistema inmunitario actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son: tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna.

Se estima que en el 2014 hubo cerca de 9.6 millones de enfermos por TB a nivel global. La mayor incidencia se dio en Asia (56%), seguido de África (29%), algunos países de la zona del mediterráneo (8%), Europa (4%) y por último América (3%) (Figura 1) (WHO 2015\*).

Datos de la OMS sugieren que 1 de cada 3 personas en el mundo están infectadas con el patógeno. Sin embargo, se estima que de este porcentaje de personas infectadas el 66% pueden controlar la infección de manera exitosa (Enarson y Rouillon 1998) y se cree que esto se debe a que estos individuos tienen una respuesta inmune más eficaz ante Mtb. A pesar de esto, un número creciente de personas en el mundo contraen la tuberculosis debido a que su sistema inmunitario se ve comprometido por medicamentos inmunosupresores, abuso de drogas, anemia, diabetes y principalmente por ser portadores del VIH por lo que puede llegar a ser letal si no se trata a tiempo. Mtb es el segundo agente infeccioso con mayor número de incidencias a nivel mundial solo superado por el VIH (WHO 2015\*).



**Figura 1.- Incidencia de TB en el 2014.** En este mapa se muestran los casos de incidencia de Tuberculosis en 2014. En color verde se muestran los países en los cuales hubo casos nuevos de la enfermedad (Figura tomada de WHO 2015\*).

## TUBERCULOSIS MULTIDROGO-RESISTENTE.

A pesar de ser una enfermedad que puede llegar a ser mortal y que además cuenta con un gran número de incidencias anualmente, esta puede ser erradicada mediante el uso de fármacos antituberculosos (de primera línea) debido a su alta eficacia y bajo costo los fármacos de primera opción son: isoniazida y rifampicina. Sin embargo, la resistencia antimicrobiana es un fenómeno común en todos los microorganismos, formando parte de su respuesta frente a la agresión externa y *Mtb* no es la excepción. Desgraciadamente el uso inadecuado de estos fármacos ha generado el surgimiento de cepas que son resistentes a ellos. Así la Tuberculosis multidrogo-resistente se define, cuando existe resistencia a la isoniazida y rifampicina. Asimismo, se define Tuberculosis extensamente resistente cuando además de los antes

mencionados, existe resistencia a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (p.ej., capreomicina, kanamicina y amikacina), (Bogdan et al., 1991) por lo que opciones de tratamiento, para estas cepas son muy limitadas. Por tanto, es crucial que al control de la tuberculosis se le dé la importancia debida. Este tipo de cepas resistentes se encuentran distribuidos en los 92 países (principalmente en Europa) en los cuales se ha reportado la enfermedad (WHO 2015\*\*). Por todo lo anterior, esta enfermedad fue declarada una emergencia global en 1993 por la OMS (Davies, 2007).

Como menciona García y col. (1995) la situación en México no es más alentadora, ya que se calcula, existen un total de 39 a 59 casos de infección por Mtb por cada 100000 habitantes. La TB representa la décima causa de mortalidad general y se estima que ocurren 6000 defunciones por año a causa de la TB. Todo esto en conjunto hace necesario un mayor esfuerzo en la investigación, para comprender los posibles mecanismos moleculares que ha adquirido Mtb para una infección exitosa, además de los procesos que el sistema inmune desencadena para combatir al patógeno para, de esta forma identificar nuevos blancos terapéuticos o estrategias efectivas en el control de Mtb.

## **ANTECEDENTES.**

### **EL SISTEMA INMUNE JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN EL CONTROL DE INFECCIONES.**

El sistema inmune surgió a través de la evolución de organismos multicelulares como un mecanismo de defensa contra agentes patógenos. El reconocimiento inmunitario es notable por su capacidad de distinguir lo propio de lo extraño.

El sistema inmune está constituido por dos tipos de respuestas: respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta inmune innata se caracteriza por incluir mecanismos moleculares y celulares que ya se encuentran en un individuo antes de la infección. La respuesta inmune adaptativa se genera a partir de la innata y comienza pocos días después de la infección inicial. Esta última se caracteriza por ser más específica y

especializada y además por ser capaz de generar memoria contra el patógeno causante de la infección (Kindt *et al* 2007).

Las células del sistema inmune surgen a partir de un proceso llamado hematopoyesis, en la cual a partir de una célula madre hematopoyética se generan la línea mieloide y linfoide. A partir de la línea mieloide se originan células progenitoras de eritrocitos, leucocitos (monocitos-macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos) y megacariocitos. La línea linfoide da origen a células asesinas naturales (NK), células progenitoras de linfocitos T y de linfocitos B (Quesenberry 2001).

Los macrófagos son células especializadas en la destrucción de patógenos, agentes extraños, partículas insolubles y material exógeno, todo esto lo hacen con el fin de prevenir el desarrollo de enfermedades. La adhesión de partículas extrañas a algún receptor del macrófago, induce rearrreglos en la membrana plasmática y en el citoesqueleto dando como resultado la generación de pseudópodos. Estos participan en la fagocitosis de la partícula extraña y la internalizan en una estructura delimitada conocida como fagosoma. El fagosoma se fusiona con el lisosoma formando un complejo conocido como fagolisosoma. Los lisosomas contienen enzimas hidrolíticas que digieren el material fagocitado (Kindt *et al.*, 2007).

Generalmente los macrófagos están en reposo, pero pueden ser activados por diversos estímulos: fagocitosis, citocinas, componentes de bacterias (patrones moleculares asociados a patógeno) como lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos nucleicos, flagelina, etc. El macrófago reconoce a estas moléculas gracias a diferentes procesos receptores expresados en las membranas celulares. Una vez activados los macrófagos, éstos mejoran su capacidad fagocítica, incrementan su habilidad para eliminar a los microbios ingeridos, aumentan la secreción de mediadores inflamatorios y mejoran su capacidad de activar células T. Esto es por que expresan mayor cantidad de complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II), por lo que funcionan como células presentadoras de antígeno muy efectivas. Además producen sustancias citotóxicas, capaces de destruir a patógenos intracelulares o extracelulares, mediante mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. Entre de los mecanismos dependientes de oxígeno están: el estallido respiratorio y la producción de óxido nítrico. El estallido respiratorio es un proceso biológico en el cual algunas células del sistema inmune son capaces de generar y liberar especies reactivas de oxígeno, como el superóxido y el

peróxido de hidrógeno, un proceso caracterizado por un aumento excesivo en la demanda de oxígeno. En este proceso la NADPH oxidasa cataliza la reducción de oxígeno a aniones superóxido (que es una molécula extremadamente tóxica para los microorganismos ingeridos por la célula). A partir del ion superóxido se generan radicales hidroxilo e iones peróxido a través de la peróxido dismutasa. La producción de óxido nítrico aumenta cuando los macrófagos son activados con lipopolisacáridos (paredes bacterianas), o con el dipéptido muramil (en el caso de micobacteria), en presencia de IFN $\gamma$  producido por las TH1 (células colaboradoras o TH helpers por sus siglas en inglés) o células NK (células asesinas, natural killers por sus siglas en inglés). El óxido nítrico tiene una actividad antimicrobiana potente, la cual es sinérgica al combinarse con superóxido. Sin embargo, los macrófagos también sintetizan moléculas que son independientes de oxígeno como las lisozimas, enzimas que digieren mucopéptidos de las paredes bacterianas por lo que funciona como un agente antimicrobiano no específico. Los macrófagos también producen defensinas, las cuales son péptidos pequeños que forman canales permeables a iones en la membrana de las bacterias (Murray and Wynn, 2011).

## INFECCIÓN DEL MACRÓFAGO POR MYCOBACTERIUM.

La infección por Mtb comienza cuando se inhalan aerosoles contaminados con el bacilo. Estos bacilos llegan a la zona alveolar de los pulmones en donde interaccionan con las células dendríticas y macrófagos alveolares. Estas células son capaces de reconocer a la bacteria gracias a diferentes receptores que se encuentran en la membrana celular.

Entre los receptores que reconocen a Mtb se encuentran: los receptores de complemento, principalmente CR3, CR1 y CR4 (Schlesinger et al., 1990), receptores de manosa, receptores scavenger (Zimmerli et al., 1996), *CD14* (Peterson et al., 1995), *CD43* (Fratuzzi et al., 2000), la proteína A del surfactante pulmonar (Pasula et al., 1997) el receptor de Dectina-1, y CCR5 (Das et al., 2014). Este último junto con el receptor TLR2 (Toll like receptor por sus siglas en inglés) son necesarios para que se lleva a cabo una fagocitosis eficiente (Figura 2). Subsecuentemente esto conllevará a la activación de la cinasa SYK seguido de la producción de diferentes citocinas entre las

que están: TNF- $\alpha$  Il-12p40 y IL-6 (Shin *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha observado que ninguno de estos receptores es esencial para la invasión del macrófago (Bhatt y Salgame, 2007) por lo que se cree que Mtb involucra más de un receptor para llevar a cabo la invasión.

Los macrófagos alveolares son un tipo de macrófagos que se encuentran en un estado de preactivación ya que estos se encuentran en constante contacto con partículas exógenas o extrañas, las cuales llegan a la zona alveolar de los pulmones a través de las vías respiratorias. Por esta razón los macrófagos alveolares suelen ser eficientes para reconocer patógenos, en este caso el bacilo de Mtb. Sin embargo, si el bacilo se enfrenta con un macrófago pobremente pre-activado o con un macrófago de una persona con inmuno deficiencias, la bacteria será capaz de infectarlo y sobrevivir, provocando la muerte del macrófago y su liberación, para poder continuar con la infección. La liberación del bacilo, desechos celulares, y otros factores quimio-atrayentes producidos por el macrófago, inducen el reclutamientos de células dendríticas y monocitos, estos últimos se diferenciaran a macrófagos en los alveolos, por lo que la bacteria se aprovecha de su estado inactivo para infectarlos y así crear un estado de simbiosis entre el bacilo y el macrófago en donde, ambos interaccionan pero no se destruyen (Dannenberg and Rook, 1994).

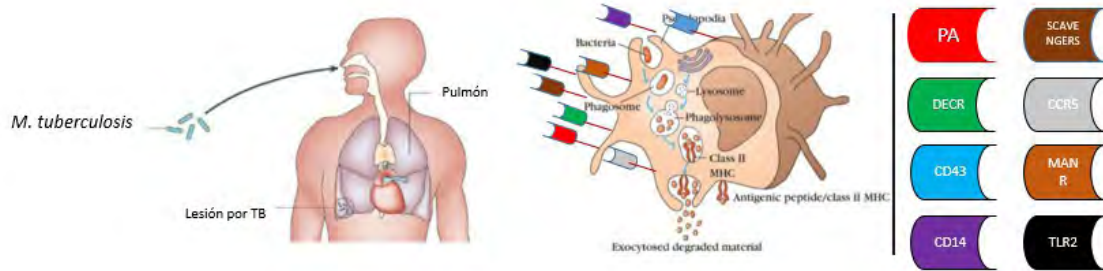
A pesar de que el macrófago es una célula especializada para fagocitar y degradar patógenos, Mtb ha desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune innata dirigida por los macrófagos y la adquirida dirigida por los linfocitos T. De esta manera previene la maduración de los fagosomas, evitando la fusión con los lisosomas, logrando así vivir dentro del fagosoma por un largo tiempo (Armstrong y Hart,1971; Russel 2001). Además, Mtb induce al macrófago a secretar citocinas anti-inflamatorias, modulando así la actividad del sistema inmune adaptativo. Aunado a esto, Fulton y Col. (2004) observaron que tras la infección de *M. tuberculosis*, los macrófagos alveolares redujeron considerablemente la expresión de MHC-II en la membrana, inhibiendo así la activación de células T contiguas, y consecuentemente ocasionando que se inhiba la destrucción de la célula infectada. De esta forma la bacteria promueve su supervivencia

A)

B)







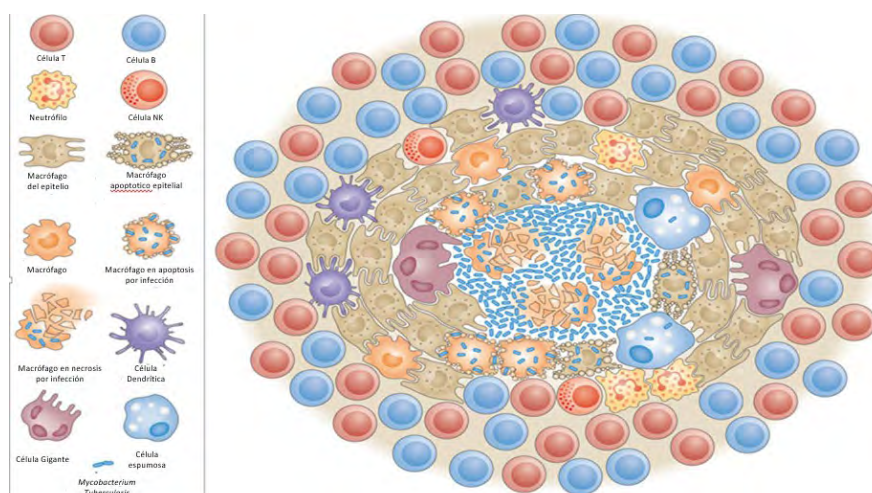
**FIGURA 2.- Mtb es reconocido por varios receptores e infecta al macrófago.** A) La infección comienza al inhalar aerosoles contaminados con Mtb. Una vez inhalado el bacilo, este se abrirá paso hasta llegar a la zona alveolar de los pulmones. B) Es en esta zona donde interactuara con los macrófagos alveolares los cuales reconocerán a la bacteria a través de varios receptores como: Los tipo scavengers, receptores de Dectina (DecR), CD43, CD14, la proteína A del surfactante pulmonar (PA), CCR5, receptores del complemento (CR), receptores de manosa (ManR) y TLR2.

### *M. TUBERCULOSIS Y M. BOVIS BCG.*

Mtb y *M. bovis* son dos cepas patógenas que pueden afectar al humano y son la causa de millones de muertes a nivel mundial, sin embargo, existe una cepa que sirve como vacuna contra la tuberculosis: la cepa *M. bovis* BCG (Bacillus de Calmette y Guérin,). Esta vacuna se prepara a partir de extracto atenuado de *M. bovis* que ha perdido su virulencia pero sigue manteniendo su poder antigénico. Ya que es capaz de infectar y ser reconocido por TLR2 activando la vía de transducción de señales fosfatidil inositol (PI3K), proteína cinasa K (PKC) y las map cinasas (MAPKs). Además puede inducir apoptosis en macrófagos, un paso necesario para hacer más eficiente la respuesta inmune. También se ha comprobado que tanto la cepa virulenta, como la cepa atenuada tienen un crecimiento muy similar y que este crecimiento solo se ve acelerado en pulmón y no así en otros órganos (Crouch E, Wright J et al., 2001). De manera interesante BCG induce más apoptosis que las cepas más patógenas como son H37Ra, H37Rv y *M. bovis*, esto tiene mucho sentido pues quiere decir que esta cepa atenuada puede ser controlada mediante la inducción de la muerte celular y de esta forma no propagarse a través del organismo (Ghorpade et al., 2012; Keane et al., 2000).

### EL GRANULOMA.

Los macrófagos infectados llegan al epitelio pulmonar invadiéndolo e induciendo una respuesta inflamatoria mediante la producción de citocinas, como el  $TNF\alpha$ . Ésta citocina juega un papel importante en el control de la infección ya que su producción conlleva a el reclutamiento de neutrófilos, células NK,  $CD4+$  y  $CD8+$ , las cuales rodean a los macrófagos infectados, formando los granulomas (conglomeración de células inmunes principalmente macrófagos células dendríticas linfocitos T y células NK) (Figura 3) que, generalmente se generan cuando el sistema inmune intenta aislar patógenos extraños que no pudo eliminar de manera eficaz. Al formarse el granuloma, el sistema inmune mantiene contenida a la bacteria, evitando que infecte a otras células, de esta forma el bacilo puede permanecer latente y la infección ser asintomática y no contagiosa. Sin embargo, esta estructura se puede ver comprometida por malnutrición, envejecimiento o inmuno deficiencia. En éstos casos, el granuloma pasa a una fase de decaimiento y se vuelve una masa amorfa de desechos celulares, liberando miles de bacilos, volviendo así a su forma infecciosa (Aung et al., 2002).



**Figura 3.- Formación del Granuloma.** Cuando la bacteria no puede ser destruida por el macrófago, este produce citocinas que reclutan a otras células, como: linfocitos T y B, neutrófilos, células NK, células dendríticas, células gigantes y células espumosas. Las cuales forman un complejo celular, cuya principal función es la de contener a la bacteria para evitar su propagación por el organismo figura tomada y modificada de (Ramakrishnan, 2012).

El interferón gamma ( $INF\gamma$  por sus siglas en inglés) es una citocina producida por los linfocitos T y células *natural killer* (NK) cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa jugando un papel fundamental en el control de Mtb. En individuos con defectos en la

producción de  $\text{INF}\gamma$  se presentan problemas para controlar la infección causada por *Mtb* (Rosenzweig and Holland, 2005). No obstante, la acción de  $\text{INF}\gamma$  no es suficiente para controlar la enfermedad. Se ha reportado que individuos con niveles normales de  $\text{INF}\gamma$  son también susceptibles a *Mtb*, pero en menor grado que los deficientes, lo cual se ha atribuido a que *Mtb* promueve la producción de citocinas con actividad inmunosupresora, como  $\text{TGF}\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$  por sus siglas en inglés) o IL-10 (Hirsch et al., 1999).

. Estos datos, en conjunto, sugieren que el balance entre estas citocinas dicta el resultado de la infección con *Mtb*. De hecho, el suministrar  $\text{INF}\gamma$ , anticuerpos anti-IL-10, o la forma soluble del receptor del  $\text{TGF}\beta$  mejora el control de la enfermedad en humanos y en ratones (Gong et al., 1996; Hernández-Pando et al., 2006; Hirsch et al., 1999). Por tanto otra alternativa viable para controlar la enfermedad, sería reducir los niveles de expresión de  $\text{TGF}\beta$  e IL-10. Sin embargo, para lograr esto es necesario conocer las vías de señalización que activa la micobacteria en el macrófago que resultan en la expresión y producción de  $\text{TGF}\beta$  e IL-10.

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-10 EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *Mtb*.

La IL-10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas, es una citocina multifuncional cuya principal función es regular negativamente la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de citocinas generadas por linfocitos T, monocitos y macrófagos. Además, se ha observado que regula el crecimiento y diferenciación de células B, células NK, linfocitos T, granulocitos, células dendríticas, queratinocitos y células endoteliales (Moore et al., 2001)

Como ya se mencionó antes, la infección con *Mtb* induce rápidamente la secreción de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$  por monocitos y macrófagos (O'Leary et al., 2011; Sendide et al., 2005). Sin embargo IL-10 puede inhibir la función de estas citocinas, disminuyendo la respuesta inflamatoria y la actividad de los macrófagos. De manera interesante, se ha observado que en personas con VIH se presentan altas concentraciones de IL-10 en pulmones, promoviendo así la supervivencia de *Mtb* en la

zona alveolar (Patel et al., 2011) Aunque la expresión de IL-10 se puede detectar desde 24 h. en sobrenadantes de macrófagos infectados con Mtb (Fratuzzi et al., 2000), las vía(s) de señalización que conlleva a su expresión en respuesta a la infección con Mtb aún no se conocen del todo bien.

Se sabe que, Dectina-1, un receptor de lectina tipo C (CRL) y el principal receptor de  $\beta$ -glucanos, reconoce a Mtb. La unión de los ligandos de Mtb con la Dectina-1 desencadena una variedad de respuestas celulares a través de la vía de señalización SYK/CARD9, incluyendo fagocitosis, estallido respiratorio y la activación de factor de transcripción NF $\kappa$ B, el cual induce la expresión de citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (Marakalala et al., 2011).

La proteína SYK (spleen tyrosine kinasa por sus siglas en inglés) es un miembro del grupo de tirosin cinasas citoplasmáticas que se expresa ampliamente en células hematopoyéticas y en tejidos no hematopoyéticos como hígado, epitelio nasal y mamario.

SYK desempeña funciones esenciales en las señales mediadas por inmuno receptores, la citotoxicidad mediada por células natural killer o la maduración de linfocitos. A pesar de que se ha asociado mayormente la actividad de SYK en la inmunidad adaptativa. Recientemente se ha descrito que SYK juega un papel importante en la inmunidad innata, como la de promover la expresión de IL-10 en macrófagos y generar un respuesta anti-inflamatoria (Marakalala et al., 2010) entre otros. Sin embargo, poco se sabe acerca de las vías de señalización río debajo de SYK que promuevan la expresión de IL-10 en respuesta a Mtb y cualquier patógeno.

### STAT3.

El transductor de señal y activador de la transcripción 3, también conocido como STAT3, es un factor de transcripción codificado en humanos por el gen *STAT*.

STAT3 pertenece a una familia de proteínas conocidas como STATs. Las STATs son proteínas implicadas en procesos inmunes, proliferación y diferenciación, estas proteínas funcionan como factores de transcripción, es decir regulan la expresión de ciertos

genes blanco. Para que estas proteínas puedan ser activas, es necesario que sean fosforiladas. Generalmente esto sucede a través de una tirosina cinasa conocida como JAK, las cuales forman parte de una familia de proteínas pertenecientes a las enzimas asociadas a receptores de citocinas. Estas cinasas cuentan con una estructura formada por cuatro dominios: Dominio ERM (interviene en la unión de la proteína con las membranas), dominio SH2 (se une a los péptidos que contienen fosfotirosinas), dominio de homología con una proteína cinasa y el dominio proteína cinasa (única región de la proteína con actividad enzimática conocida). En el estado basal, las JAKs se encuentran unidas al receptor, el cual dimerizan cuando se unen a su hormona o ligando, cuando esto ocurre se aproximan dos cinsas JAK que se fosforilan de manera cruzada, incrementando su actividad. La cinasas JAK activas fosforilan el receptor en residuos de tyrosina que sirven de unión par las proteínas STAT, las cuales son fosforiladas por la cinasa JAK.(Horvath, 2000; Shuai and Liu, 2003a)

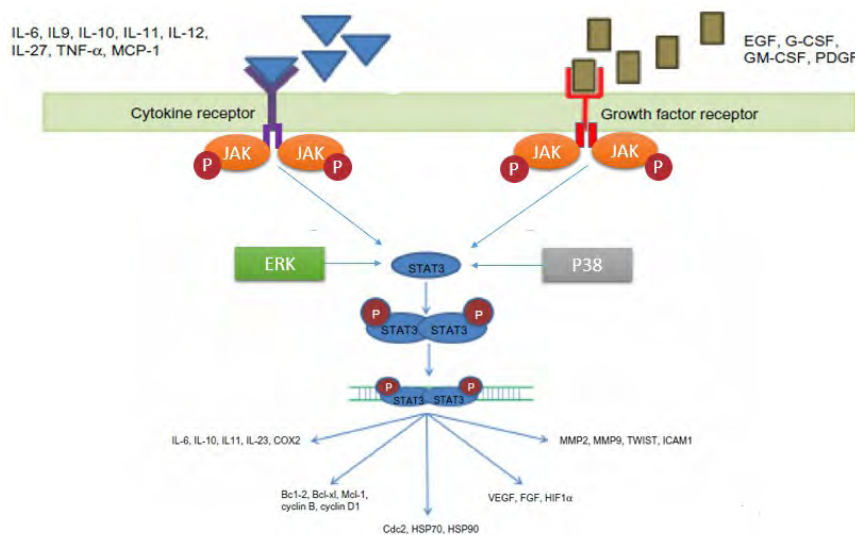
Las proteínas STATs después de ser fosforiladas, se dimerizan y se translocan al núcleo (Figura 4) (Shuai and Liu, 2003; Zhou et al., 2013). Sin embargo, la actividad transcripcional de STAT1 y STAT3 se incrementa cuando en el núcleo son fosforiladas en residuos de serinas por las MAP (Mitogen-Activated Protein por sus siglas en inglés) cinasas, como ERK y p38 (Chung et al., 1997; Decker and Kovarik, 2000).

### STAT3 REGULA LA EXPRESIÓN DE IL-10.

Se ha reportado que STAT3 juega un papel importante en la regulación de IL-10 en respuesta a un patógeno en diferentes modelos como en células B, macrófagos y monocitos. En células B estimuladas con LPS, el factor de transcripción STAT3 se une a un elemento de respuesta localizado en la posición -120 del promotor del gen de IL-10 y promueve su transcripción (Schaefer et al., 2009). Adicionalmente, O'leary y col. (2010) demuestran que STAT3 juega un papel importante en la regulación de la maduración del fagosoma en respuesta a Mtb, sugiriendo que la inhibición del fagosoma, por IL-10 en macrófagos infectados con Mtb es en parte mediada por STAT3. Además, Martínez-Neri y col. (2014) demuestran que los niveles de fosforilación de STAT3 aumentan cuando estimulan células THP-1 con extractos proteicos de *M.bovis*.

Por otra parte, se ha descrito que además de su regulación por las JAK cinasas (O'Shea and Murray, 2008) STAT3 también es fosforilado y activado por SYK, esto ha sido reportado en linfomas de células B (Uckun et al., 2010). Además, Zhou y col. (2012) demuestran que para la agregación de plaquetas es necesaria la fosforilación de STAT3, la cual, es activada por SYK, sin embargo, en este contexto STAT3 funge como proteína de andamiaje y no como factor transcripcional.

En conjunto estos datos sugieren que a través de la activación de STAT3, Mtb podría regular la expresión de IL-10.



**Figura 4.- Vía de señalización de las JAK/STAT.** Una vez que el ligando interacciona con su receptor específico, el cual está asociado a una JAK, JAK fosforila a STAT, esta a su vez forma un dímero con otra STAT fosforilada y es translocada al núcleo donde interacciona con el promotor de algún gen blanco promoviendo así su transcripción (Figura tomada de Shuai et al 2003).

## HIPÓTESIS

Dado que el promotor de *IL-10* contiene sitios potenciales de respuesta a factores de transcripción de la familia de los STATs, proponemos STAT3 regula la expresión de IL-10 en células THP-1 infectados con *M. bovis*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que STAT3 regula la expresión de IL-10 en respuesta a la infección del macrófago por *M. bovis*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- 1.-Evaluar si *M. bovis* induce la activación de STAT3 en macrófagos.
- 2.-Determinar si STAT3 participa en la expresión de IL-10 inducida durante la infección del macrófago con *M.bovis*.
- 3.- Demostrar que *M. bovis* induce la interacción de STAT3 con el promotor de *IL-10*.

## **METODOLOGÍA.**

### **CULTIVO CELULAR.**

Para este trabajo se utilizó la línea celular de monocitos de sangre periférica THP-1 (Tib 202 ATCC) cultivada en un medio RPM1 1640 (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO-Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina 1µg/ml, estreptomina 1µg/ml, glutamina 2 mM, y se mantuvieron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

### **DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS THP-1.**

La viabilidad de las células THP-1 se determinó por exclusión de azul de tripano, mediante el conteo celular en una cámara de Neubauer. Se sembraron 250,000 células viables en cajas de 35 mm de diámetro (para extractos totales) y 1,500,000 de células viables en cajas de 60 mm para extractos nucleares. Las células se diferenciaron añadiendo forbol 12-miristato 13-acetato (TPA) al medio de cultivo a una concentración final de 50 ng/ml. Después de 24 h. las células no diferenciadas y por lo tanto no adherentes, se eliminaron lavando con PBS 1X. Los macrófagos diferenciados, fueron cultivados por 48 h. más, por lo que los macrófagos se diferenciaron durante 72 h. antes de la activación.

### ACTIVACIÓN CELULAR.

Antes de la estimulación (12 h), se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS, posteriormente se agregó medio RPMI sin suero. Para la activación de los macrófagos se utilizó, el bacilo atenuado de *M. bovis*, obtenido de la vacuna BCG (cepa danesa 1331, Staten Serum Institute), a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 a diferentes tiempos de infección (5, 15 y 30, 60 y 120 min.). Una vez terminado el tiempo de incubación, se lavaron las células con PBS y se congelaron a -70°C hasta su uso.

### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Para la obtención de extractos protéicos totales a cada caja de cultivo de 35 mm de diámetro se le agregaron 50 µl de buffer de lisis TLB (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, β-glicerolfosfato 25 mM, Pirofosfato de sodio (PPiNa) 2 mM, EDTA 2mM pH 7.4, Triton X-100 1%, Glicerol 10%) con inhibidores de proteasas (Pepstatina A 5 µg/ml, Leupeptina 5 µg/ml, Antipaina 5 µg/ml, Aproptinina 5 µg/ml, PMSF 1 mM) así también un inhibidor de fosfatasas (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 µM), un agente reductor (DTT 0.5 mM) y posteriormente se rasparon. Las células en buffer de lisis se recolectaron y se depositaron en tubos eppendorf; y fueron incubados 15 min a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 14,000 RPM a 4°C por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a



tubos nuevos. La cantidad de proteína en los extractos se determinó por el método de Bradford. Se tomaron 50 µg, se le agregaron 5µl buffer de carga 6x (4x Tris/SDS pH=6.8, glicerol, SDS, 2-ME o DTT, Azul de bromofenol y H<sub>2</sub>O) y se llevó a un volumen final de 30 µl con H<sub>2</sub>O.

## WESTERN BLOT.

Se cargaron 50µg de proteína en geles de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes) al 10%. Los geles se corrieron a 35 mili amperes (mA) por una hora hasta que el azul de bromofenol llegó al borde inferior del gel. Posteriormente las proteínas se transfirieron por 90 min a 100 volts a una membrana de nitrocelulosa en cámara de transferencia húmeda que se llenó con buffer de transferencia (Glicina 200mM, Tris 25mM, Metanol 20%). La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBS (Tris-base 50 mM, NaCl 150 Mm) 1X-Tween (0.1%) (TBS-T) en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana, se incubó con anticuerpo primario anti p-STAT3, STAT3 (Cell Signaling) en albumina sérica bovina (BSA) al 5% en TBS-T o con anticuerpos anti-ERK 1/2 fosforilado (Santa Cruz Biotecnology) y anticuerpos anti-ERK 2 en leche al 5% en TBS-T durante toda la noche en agitación a 4°C. Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces por 5 min. con TBS-T. Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano, se utilizaron diluidos 1:5000 en leche al 5% o en BSA 5% dependiendo en que hayan sido incubadas previamente.

## TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* DH5α.

Se transformó la cepa de *E. coli* DH5α agregando 3µl de la ligación (pGL3 + promotor de IL-10) o (Luc-2 + STAT3/MUT) y se incubó en hielo por 60 min. Después se realizó un choque térmico a 42°C por 2 min. y los tubos se incubaron en hielo por 5 min. más, posteriormente se le agregó 1 ml de LB a las muestras y se incubó a 37°C en agitación durante 1 h. después se tomaron 100µl de células transformadas y se plaqueó

en cajas de LB con Ampicilina 100mg/ml, las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 h.

### MINIPREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA.

Se seleccionaron colonias aisladas las cuales fueron puestas en 2 ml de LB líquido con ampicilina e incubó toda la noche a 37°C, del cultivo líquido se tomaron 1.5 ml y fueron colocados en un tubo eppendorf, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 15 RPM durante 1 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue re-suspendido con 100 µl de solución 1 fría (EDTA 10 mM, Glucosa 10 mM Tris-HCl pH 8 25 mM) y se agitó vigorosamente, después se adicionaron 200 µl de solución 2 (NaOH 10 N, SDS 10%), se mezcló por inversión de 8-10 veces y finalmente se agregaron 150 µl de la solución 3 fría (Acetato de potasio 5M, Ácido acético glacial 5ml)) se agitó suavemente con el tubo boca abajo. Las muestras fueron incubadas en hielo por 5 min. y después fueron centrifugadas durante 5 min. a 14 RPM. El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos (este tiene el DNA), después se agregaron 900 µl de etanol absoluto y se mezcló por inmersión 8-10 veces, posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 x g. por 5 min. se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%. Se desechó el sobrenadante y los tubos se dejaron abiertos para secar las pastillas (10-15 min). Finalmente se re suspendió la pastilla con 50 µl de H<sub>2</sub>O.

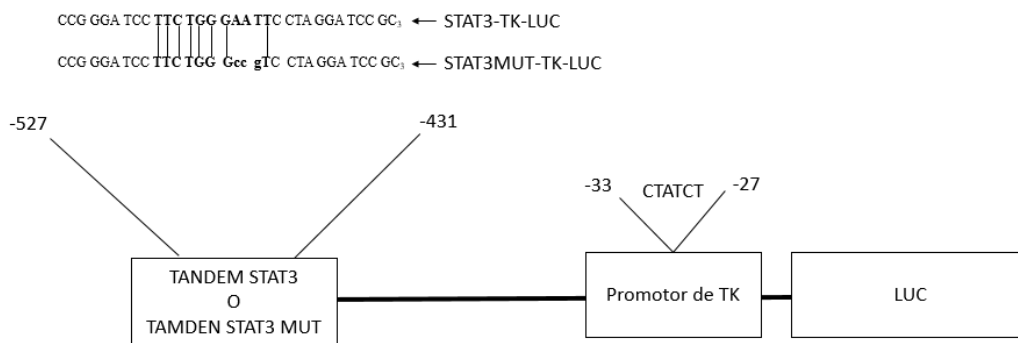
### DISEÑO DE VECTORES STAT3-TK-LUC Y STAT3mut-TK-LUC.

Para este trabajo se diseñaron diferentes plásmidos para poder evaluar la actividad transcripcional de STAT3. Primero se diseñaron dos vectores, uno que tuviera la secuencia consenso de unión de STAT3 y otro la secuencia de unión de STAT3 mutada, río arriba de un promotor que normalmente no es regulado por STAT3, en este caso el promotor de la timidina cinasa (TK), para lo cual se usó el vector LUC2 (Figura suplementaria 1).

La secuencia consenso de unión de STAT3 (Yu et al., 1995) se sintetizó formando un tándem con tres repeticiones (CCG GGA TCC TTC TGG GAA TTC CTA GGA TCC GC)<sub>3</sub> la misma acción fue realizada con el sitio mutante (CCG GGA

TCC TTC TGG **Gcc gTC** CTA GGA TCC GC)<sub>3</sub>, Estas secuencias fueron generadas con sitios de restricción para *Xma*I por ambos extremos (el sitio de restricción de *Xma*I se encuentra subrayado y la secuencia consenso se encuentra en negritas). Después de un proceso de transformación bacteriana y purificación de plásmido se obtuvo la construcción STAT3-TK-Luc y STAT3mut-TK-Luc (Figura suplementaria 2).

Una vez confirmadas las construcciones por patrones de restricción, los vectores se secuenciaron para verificar que los sitios clonados no hayan sufrido alguna mutación o algún cambio en las bases (figura 5). Fue necesario verificar esto ya que los sitios de unión de STAT3 son muy específicos y cualquier cambio en alguna base podría alterar o desfavorecer la unión del factor de transcripción al DNA.



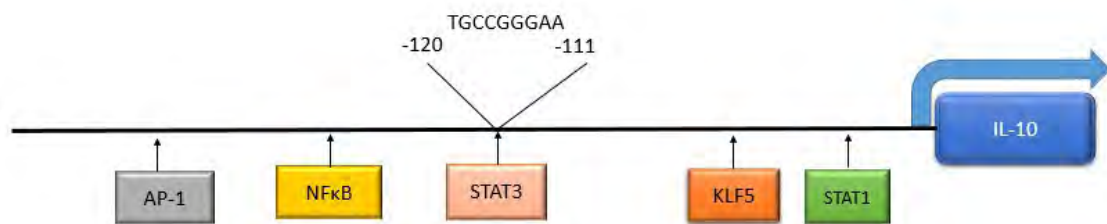
**Figura 5.- Construcciones STAT3-TK-Luc/ STAT3mut-TK-Luc.** Esquema de las fusiones que tienen las secuencias de unión consenso de STAT3 y la secuencia consenso mutante de STAT3, las cuales fueron clonadas río arriba del promotor mínimo de la timidin cinasa (TK), seguido del gen reportero de la luciferasa.

## DISEÑO DE VECTORES PGL3-PIL10 Y PGL3-PIL10mut.

Para poder evaluar si *M. bovis* BCG induce la expresión de IL-10 vía STAT3, fue necesario hacer construcciones en el vector PGL3 (Figura suplementaria 2) en donde clonamos el promotor de la IL-10 y el promotor de IL-10 mutado en las bases críticas para la interacción de STAT3 con su sitio de unión.

Previamente se demostró, que el promotor de gen humano de IL-10 presenta un sitio de unión de STAT3 (-120 río arriba del gen de *IL10*)(Werner et al., 2015). Para

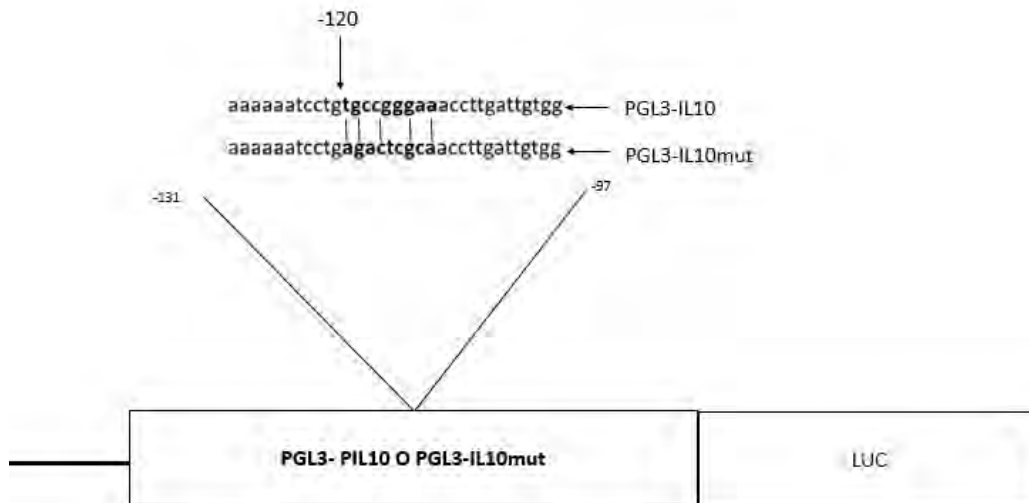
confirmar estos datos, realizamos un análisis *in silico* utilizando el programa MAT-Inspector (Genomatix software Munich Alemania) y analizamos el promotor de IL-10. En esta secuencia encontramos varios sitios de unión de diversos factores de transcripción (Figura 6), entre ellos el sitio previamente descrito (-120) que correspondían al sitio de STAT3 por lo que decidimos solamente trabajar con -357 pb de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de IL-10, el fragmento se obtuvo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Figura suplementaria 2) utilizando los oligonucleótidos GTT CTC GAG AGG AAA TCA ACT TTT TTT AAT TG y AGC TAA GCT TGC CTT CTT TTG CAA GTC TG. El fragmento que contiene el promotor de IL-10 (pIL-10) fue diseñado para tener los sitios de corte de las enzimas *XhoI* y *HindIII*, por lo que el vector PGL3 fue digerido con estas enzimas y posteriormente el fragmento pIL-10 fue clonado en PGL3 río arriba del gen que codifica para la luciferasa (Figura suplementaria 3).



**Figura 6. Factores de transcripción que se unen al promotor de IL-10-** Esquema de los factores de transcripción que se unen al fragmento de 357 pb del promotor de IL-10. Análisis realizado con MAT-Inspector (Genomatix software).

Para confirmar que el fragmento estuviese correctamente clonado, se realizaron digestiones con *XhoI* y *HindIII*. Finalmente terminada la construcción de este plásmido, se mandó a secuenciar para corroborar que el fragmento clonado correspondiera, al promotor de IL-10.

Una vez que se obtuvo esta construcción, se procedió a mutar el sitio de unión de STAT3 del promotor de IL-10 cambiando 5 bases del sitio de unión de STAT3 (Figura 7).



**Figura 7.-Esquema de las construcciones de los vectores PGL3- PIL10 y PGL3-IL10mut.** Esquema de las fusiones del promotor de *Il-10* secuencia silvestre A) o con la secuencia mutante B) con el gen reportero de la luciferasa. En ambas figuras se muestran 34 pb de bases internas del fragmento y en negritas (9pb) esta el sitio de reconocimiento de STAT3A). En la figura inferior se muestran las 5 mutaciones que se hicieron al sitio al sitio de reconocimiento de STAT3 B).

## MUTAGÉNESIS.

Para generar una construcción que tuviera mutado el sitio de unión de STAT3, se utilizó el kit de mutagénesis (Quikchange lightning de agilent technologies) y se siguió el protocolo establecido por el manual. Se partió de -357 pares de bases del promotor de IL-10: gaccaattatttctcaatcccattgtattctggaatgggcaattgtccacgtcactgtgacctaggaacacgcgaatgaga acccacagctgagggcctctgcgcacagaaacagctgttctccccaggaaatcaacttttttaattgagaagctaaaaattattc taagagaggtagcccatcctaaaaatagctgtaatgcagaagttcatgttcaaccaatcattttgcttacgatgcaaaaattgaa aactaagtttattagagaggttagagaaggaggagctctaagcagaaaaatcctgt**gcccgggaa**accttgattgtggcttttta atgaatgaagaggcctccctgagcttacaataaaagggggacagagaggtgaaggtct. El sitio de unión de STAT3 se encuentra en negritas, con base en este sitio se generaron los oligonucleótidos para la mutagénesis en donde se cambió el sitio **tgc cgg gaa** por **aga ctc gca**. Las secuencias de esos oligonucleótidos son las siguientes. Sentido: 5'-gga gct cta agc aga aaa aat cct **gag act cgc aac** ctt gat tg-3' y anti sentido: 5'- caa tca **agg ttg cga gtc** tca gga ttt ttt ctg ctt aga gct cc-3'. Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de templado, 125 ng. del oligonucleótido, 1.5 µl del reactivo "quik solution", 1µl de la enzima "QuikChange Lightning"y 1µl de dNTP y buffer 10x. La reacción en cadena de la

polimerasa se realizó en base a los tiempos establecidos por el protocolo del kit. Inmediatamente después de la reacción, se agregó 1 µl de la enzima Dpn1 a toda la reacción de PCR y se dejó incubando durante 5 min. a 37°C, después de este tiempo de incubación, se procedió a transformar bacterias DH5α (con el protocolo previamente mencionado). Subsecuentemente, se escogieron algunas colonias candidatas que crecieran en presencia del antibiótico (ampicilina) para la elaboración de una mini preparación, de plásmidos. Después se hizo una digestión para confirmar la presencia del fragmento mutado y finalmente se mandó a secuenciar el fragmento para confirmar que el sitio en cuestión haya sido mutado y que las bases cambiadas fueran las correctas.

## OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN DE CELULAS THP-1.

Se tomaron  $2 \times 10^6$  células THP-1 y se centrifugaron 5 min. a 1 200 RPM, a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se re suspendieron las células en 100 µl de solución para Nucleofector (PBS, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 1M, Glucosa 1M, Manito1 M) o 100 µl PBS (sin dejar pasar mas de 15 min en las soluciones) y se le agregó 1 µg de vector pSuper (el cual contiene el gene que codifica para la proteína verde fluorescente GFP, que se usa como gen reportero de la eficiencia de transfección), posteriormente las células fueron transferidas a una cubeta para electroporar (*E. coli* pulser 2mm) y se colocaron en el nucleoporador (Amaxa) Se seleccionaron 2 programas, el primero fue THP-1 alta viabilidad y el segundo fue THP-1 alta eficiencia. Una vez terminado el programa a las células se les agregó medio suplementado con 20% de Suero fetal bovino, se resuspendieron y se colocaron en una caja de 35mm con 1.5 ml de suero suplementado. A las 24 y 48 h. subsecuentes se lavaron las células y se fijaron con paraformaldehído al 4% y PBS. Posteriormente se analizaron las muestras por citometría de flujo (descripción y Figura suplementaria 7). Después de varios ensayos, se decidió utilizar el programa de alta viabilidad y usando la solución de Nucleofector como solución amortiguadora, resuspendiendo cuidadosamente y sin provocar burbujas en medio RMP1 suplementado con 20% de suero fetal bovino.

## TRANSFECCIÓN Y ACTIVACIÓN.

Se transfectaron  $2 \times 10^6$  monocitos (THP-1) en 100  $\mu$ l del buffer Nuclofector con 1  $\mu$ g de las construcciones previamente descritas (STAT3-TK-LUC, MUT-TK-LUC, PGL3-PIL10, PGL3-PIL10mut respectivamente) y 200ng del vector que contiene el gen de luciferasa (Renilla) como control interno, 4 h. después de la transfección se midió la viabilidad celular por azul de tripano y se activaron las células agregándoles *M. bovis* (BCG) a una M.O.I de 3 durante 24 h. posteriormente las células se lisaron con el buffer de lisis del kit de lectura de lucifereasa promega (Dual- Luciferase Reporter Assay System) y la actividad de luciferasa se determinó en un luminómetro (FB12 Tube luminometer) de acuerdo a las instrucciones del kit. En algunos casos, después de la transfección y antes de la infección con *M. bovis* (BCG) las células fueran pre-tratadas con 10  $\mu$ M de un inhibidor de SYK ( BAY61-3606) y 50 mM de un inhibidor de JAK 2 (WHI-P131).

## ENSAYO DE ELISA (ENZYME- LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY POR SUS SIGLAS EN INGLÉS).

Los niveles de IL-10 secretado por 100, 000 monocitos THP-1, estimulados con *M. bovis* BCG durante 24 h. a una M.O.I. de 3, fueron cuantificados en el sobrenadante de cultivo por medio de ELISA tipo sándwich utilizando el kit (Biolegend Max deluxe). Como control positivo de la inducción de la producción de IL-10, los monocitos se expusieron a extractó de levadura (1mg/ml). La concentración de las citocinas fue calculada con base en la curva estándar generada utilizando IL-10 recombinante.

## ANALISIS DE CUANTIFICACION POR DENSITOMETRIA.

Se utilizó el software Image Lab <sup>TM</sup> (BIO-RAD) para obtener la densidad óptica de las bandas obtenidas de los ensayos de Wster Blot. Los niveles de proteína fosforilada fueron corregidos contra la proteína total correspondiente.

## ESTADISTICA

Los valores obtenidos de diferentes experimentos fueron reportados como medias  $\pm$  error estándar. Para comparar los datos experimentales se realizaron análisis de ANOVA de una vía y pruebas t de Student. Se considera estadísticamente significativas aquellas pruebas con un valor de  $p < 0.05$

## RESULTADOS.

### LA INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON *M. BOVIS* INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE STAT3.

Para evaluar si la infección del macrófago con *M. bovis* promueve la activación de STAT3 se diferenciaron monocitos THP-1, posteriormente los macrofagos fueron infectados con el bacilo atenuado de *M. bovis* obtenido de la vacuna BCG cepa Tokyo 171, a una M.O.I. de 3 y se determinaron los niveles de fosforilación de STAT3, como control de la inducción de la fosforilación de STAT3 se utilizó LPS (Schaefer 2009). En los primeros 15 y 30 min. después de la infección se observó que los niveles de fosforilación de STAT3 aumentaron con respecto a los niveles de células sin infectar (Figura 8). En cambio, la fosforilación de STAT3 en respuesta a LPS solo se observó 15 min. después de la estimulación, disminuyendo a niveles basales a los 30 min. (Figura 10). De acuerdo con datos previos de nuestro laboratorio (Maldonado Bravo Tesis de licenciatura 2014) y con los reportados por (Yadav et al., 2006) la fosforilación de ERK también se induce en respuesta a BCG *M. avium* y *M. bovis* (Figura 10).

Estos datos preliminares (un solo experimento) muestran que a los 15 y 30 min. después de la infección con *M. bovis* BCG STAT3 y ERK se fosforilan.

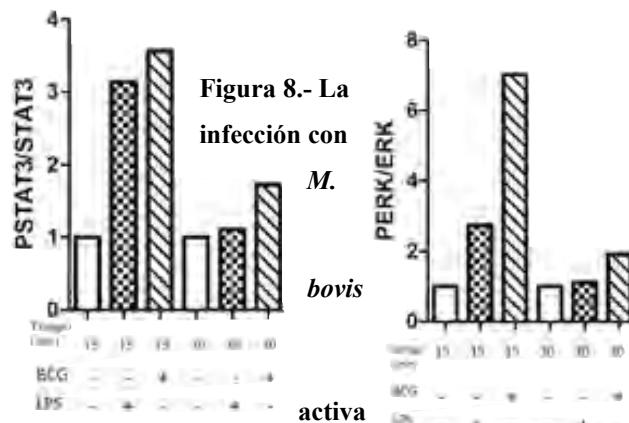
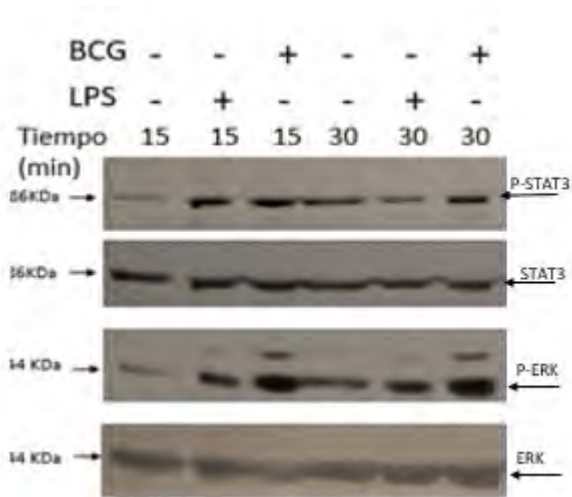
A)

B)

P-STAT3

P-ERK





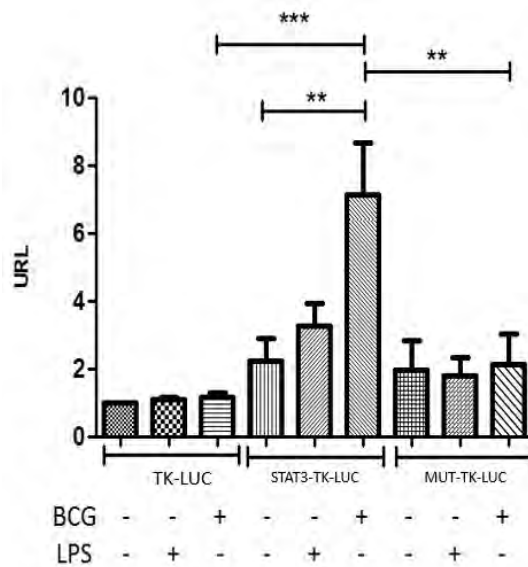
**a STAT3.** Células THP-1 diferenciadas con TPA fueron incubadas en la presencia o ausencia de *M.*

*bovis* BCG (a una M.O.I de 3) durante 15, 30 min. o con LPS (100 ng/ml). Se utilizaron 50µg de extracto proteico para realizar un Western blot utilizando anticuerpos anti STAT3, anti PSTAT3, anti ERK y anti PERK. Anti STAT3 y anti ERK fueron usados como controles de carga A). El análisis densitométrico se realizó con el programa Image lab. (Comparando el área total de las proteínas fosforiladas entre las proteínas totales) B)

### *M. BOVIS* BCG INDUCE LA TRASCRIPTIÓN MEDIADA POR STAT3.

Para determinar si la infección de monocitos THP-1 con *M. bovis* BCG promueve la actividad transcripcional de STAT3, se transfectaron células THP-1 con el vector STAT3-TK-Luc o con el vector en el que mutaron los sitios de unión de STAT3 STAT3mut-TK-Luc y 24h. después de la infección se realizaron ensayos de luciferasa.

Las células transfectadas con el vector que tiene la secuencia de unión de STAT3 (STAT3-TK-Luc) y que fueron infectadas con *M. bovis* BCG aumentaron significativamente la actividad de luciferasa en comparación con las células que no fueron estimuladas (Figura 11). Para confirmar que el incremento de luciferasa inducido por la infección con BCG es mediada por la unión de STAT3 a su sitio consenso, se evaluó la actividad de luciferasa de células transfectadas con el vector en el que se mutaron los sitios de unión de STAT3 (STATmut-TK-Luc). Como se esperaba, ni en la infección con *M. bovis* ni el estímulo con LPS indujeron un aumento en la actividad de la luciferasa, con respecto a la actividad observada en las células control (Figura 9). La actividad de luciferasa observada en las células infectadas con BCG o tratadas con LPS es similar a la obtenida de células sin estimular transfectadas con la construcción que contiene los sitios silvestres de unión para STAT3. Estos datos nos indican que BCG induce la transcripción mediada por STAT3.

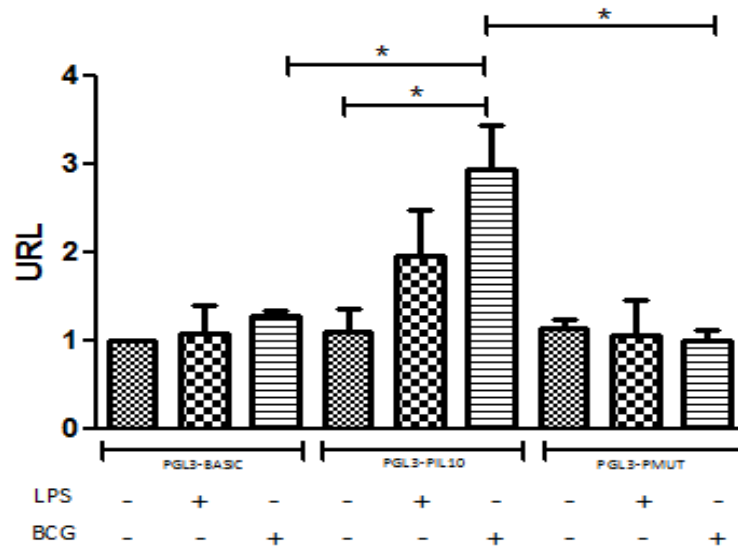


**Figura 9: *M. bovis* BCG induce la transcripción mediada por STAT3.** Células THP-1 transfectadas con 1µg del vector Luc2-STAT3 o Luc2-Mut y 200ng del vector que tiene Renilla luciferasa (como control interno) posteriormente fueron estimuladas con *M. bovis* BCG (M.O.I. de 3) o LPS (100ng/ml). En las gráficas se muestran los niveles relativos de la actividad de la luciferasa, así como la media ± la desviación estándar (n=3). \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001 (ANOVA de una vía)

### STAT3 INDUCE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN DE IL-10 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON *M. BOVIS* BCG.

Una vez comprobado que BCG induce la actividad del factor transcripcional STAT3, evaluamos si esto STAT3 regula la actividad transcripcional del promotor del gen de IL-10. Para contestar esta pregunta, se transfectaron monocitos THP-1 con los vectores que contienen el promotor silvestre del gen de IL-10 (PGL3-PIL10) o el promotor mutado (PGL3-P10mut) río arriba del gen de luciferasa. Posteriormente, los monocitos se estimularon con LPS o *M. bovis* BCG durante 24 h y se determinó la actividad de luciferasa. Como se esperaba, la actividad de luciferasa se incrementó cuando las células fueron tratadas con LPS o infectadas con BCG comparando con la actividad observada en las células no tratadas (Figura 10) e acuerdo con los datos mostrados arriba, cuando se mutó el sitio de unión para STAT3 en el promotor de gen de IL-10 no se indujo la actividad de luciferasa en respuesta a LPS o BCG (Figura 10). Estos datos

demuestran que la transcripción del gen de IL-10 en respuesta a la infección con BCG es inducida a través de STAT3

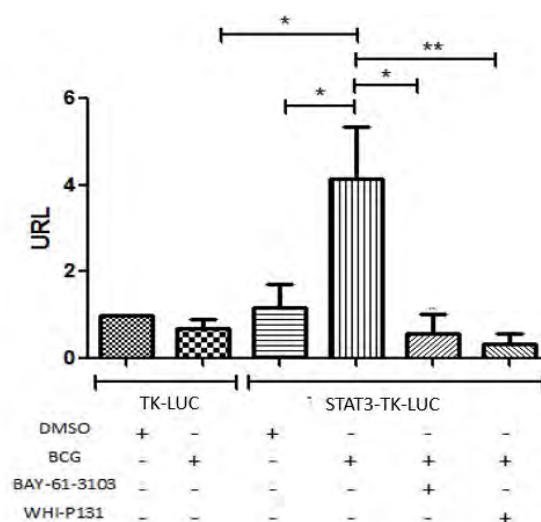


**Figura 10.- *M. bovis* induce la unión de STAT3 al promotor de *IL10*.** Células THP-1 transfectadas con 1µg del vector PGL3-PIL10 o PGL3-IL10mut o PGL3 basic (vector vacío) y 200ng del vector que tiene Renilla Luciferasa (como control interno) posteriormente fueron estimuladas con *M. bovis* BCG (M.O.I. de 3) o LPS (100ng/ml). En las gráficas se muestran los niveles relativos de la actividad de la luciferasa, así como la media ± la desviación estándar (n=3). \*. P<0.05 (ANOVA de una vía).

### JAK Y SYK SON NECESARIOS PARA INDUCIR LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR STAT3.

En nuestro laboratorio ya se había observado que al inhibir a SYK con el compuesto BAY-61-3606, los niveles de fosforilación de STAT3 disminuían aún cuando las células fueran activadas con *M. bovis* BCG (Villa señor-Toledo 2013 comunicación personal). Además, recientemente se reportó que el aumento de la producción de IL-10 en células THP-1 estimuladas con prolactina y con extractos proteicos filtrados de *M. bovis* depende de la vía de JAK (Martínez-Neri et al., 2015). Dadas estas evidencias utilizamos un inhibidor de SYK (BAY-61-3606) y un inhibidor de JAK 2 (WHI-P131) para poder determinar por cual vía se regula la actividad de STAT3 en respuesta a BCG.

De manera interesante observamos que la actividad de luciferasa de las células transfectadas con el vector STAT3-TK-Luc e infectadas con *M. bovis* BCG disminuyó drásticamente en presencia del inhibidor de SYK o de JAK2 aún por debajo de los niveles basales del control (Figura. 11). Estos datos señalan que estas cinasas juegan un papel importante en la señalización que llevan a la activación del factor transcripcional de STAT3 en células infectadas con *M. bovis* BCG.

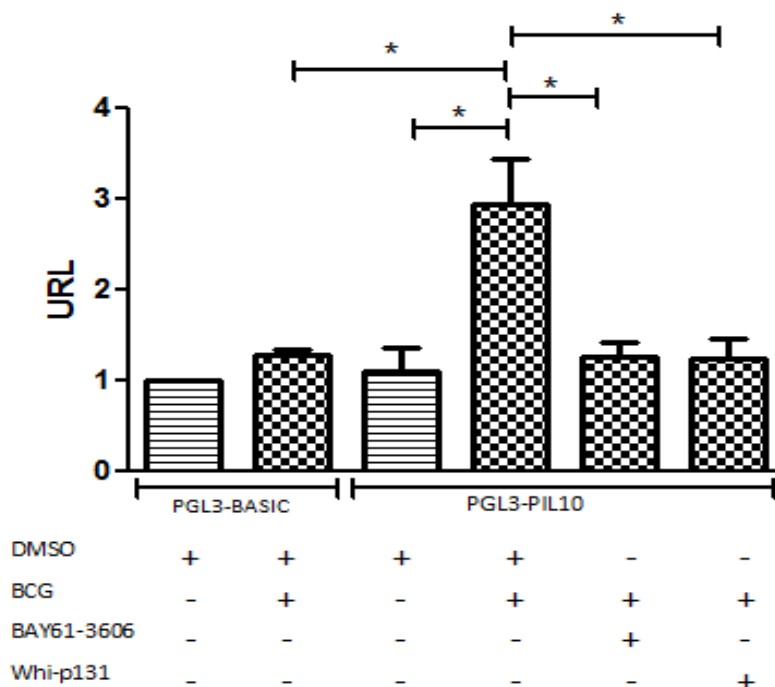


**Figura 11.- La inhibición de JAK y SYK disminuye la actividad transcripcional de STAT3.-** Células THP-1 transfectadas con 1 µg de vector Luc2 o Luc2-STAT3 y 200 ng del vector que tiene Renilla luciferasa. A las 4 h. subsecuentes de las transfección las células fueron incubadas con BAY-61-3606 (10µM por 30 min, inhibidor de SYK), WHI-P131 (50mM por 30 min. inhibidor de JAK) y estimuladas con *M. bovis* BCG a una M.O.I. de 3 En las gráficas se muestran los niveles relativos de la actividad de la luciferasa, así como la media ± la desviación estándar (n=3). \* P<0.05 \*\* P<0.01(ANOVA de una vía).

### JAK Y SYK INDUCEN LA EXPRESION DE IL-10 A TRAVES DE STAT3 EN CÉLULAS THP-1 INFECTADAS CON *M. BOVIS*.

Dado que al inhibir a SYK y a JAK se disminuye la actividad transcripcional de STAT3, evaluamos si estas cinasas también están involucradas en la inducción de la expresión del gen de IL-10 en respuesta a la infección con *M. bovis* BCG. Al igual que en los ensayos mostrados anteriormente (Figura 11) los inhibidores de SYK y de JAK disminuyeron la actividad de luciferasa resultante de la actividad transcripcional de

promotor de IL-10 inducida por la infección con BCG, (Figura 12). Estos datos sugieren que en la infección con BCG en células THP-1, SYK y JAK activan a STAT3 y este a su vez participa en la inducción de la transcripción del gen que codifica para IL-10.



**Figura 12.- La inhibición de JAK y SYK disminuye la expresión de la luciferasa en el vector PGL3-PIL10.** Células THP-1 transfectadas con 1 µg de vector PGL3-PIL10 y 200 ng. del vector que tiene Renilla luciferasa.. A las 4 h. subsecuentes de las transfección las células fueron incubadas con BAY-61-6103 (10µM por 30 min, inhibidor de SYK), WHI-P131 (50mM por 30 min. Inhibidor de JAK) y estimuladas con *M. bovis* BCG a una MOI de 3. En las gráficas se muestran los niveles relativos de la actividad de la luciferasa, así como la media ± la desviación estándar (n=3). \* P<0.05 (ANOVA de una vía).

Por otro lado, IL-6 es una citocina con actividad pro-inflamatoria, la cual es expresada por los macrófagos en respuesta a *M. tuberculosis* y a otros patógenos (Nagabhushanam et al., 2003), que por medio de un mecanismo autócrino puede inducir la expresión de IL-10 a través de STAT3. Para descartar la posibilidad de que la inducción de la transcripción del gen de *IL-10* mediada por STAT3 fuese dada por las citocinas secretadas en respuesta a la infección y no directamente por la interacción monocito-BCG, monocitos transfectados con la construcción que lleva el promotor de

IL-10 se trataron con sobrenadantes de células que fueron previamente estimuladas con BCG. Los sobrenadantes de macrófagos estimulados con BCG aumentaron ligeramente la actividad transcripcional del promotor de IL-10 respecto a la actividad observada en células sin estimular, sin embargo, esta actividad fue menor a la actividad inducida por BCG (un solo experimento) (figura 13). En conjunto, estos datos sugieren que BCG induce la transcripción de IL-10 de manera temprana, a través de STAT3 y que esta es regulada por SYK y/o JAK2

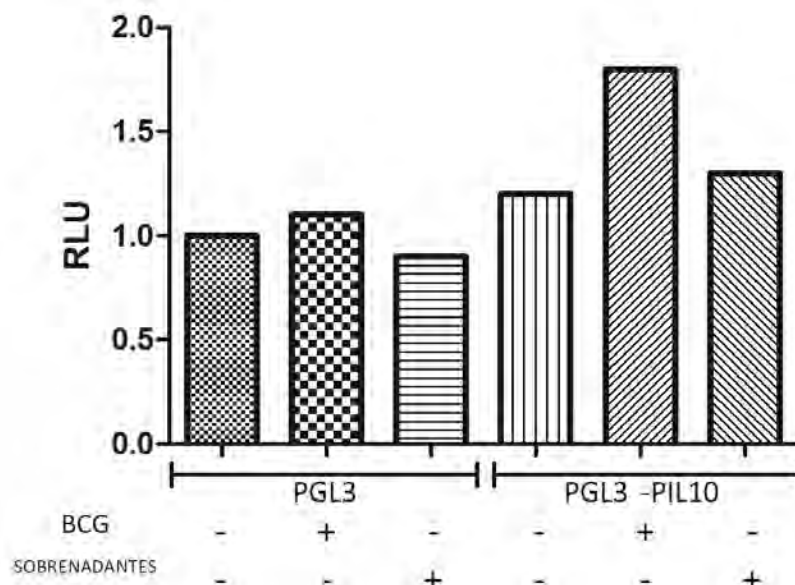


Figura 13.

La

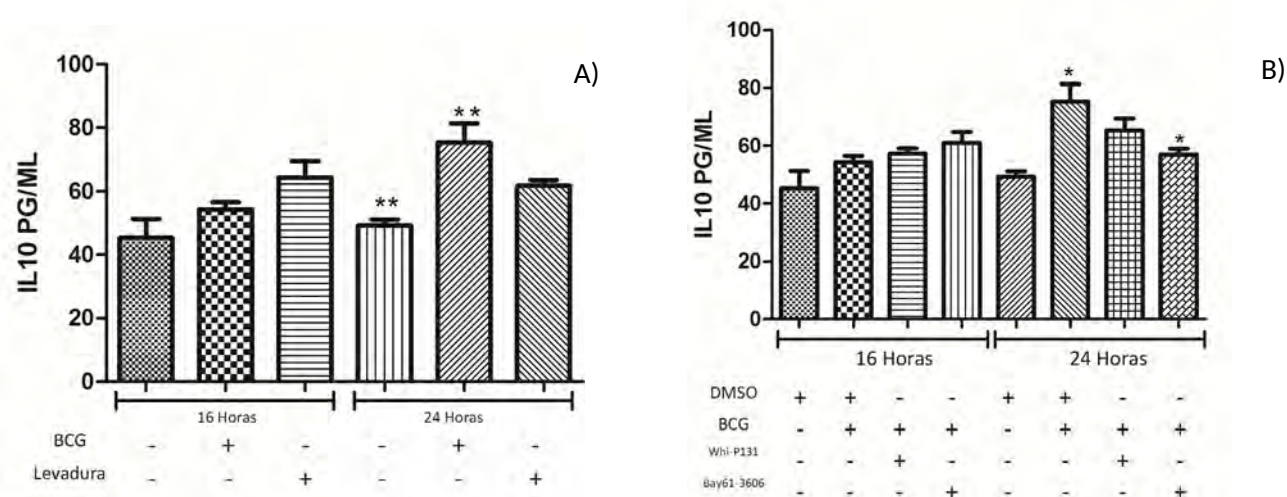
transcripción de *IL-10* es inducida de manera directa por BCG. Células THP-1 transfectadas con 1 µg de vector PGL3-PIL10 y 200 ng del vector que expresa Renilla luciferasa. Las células fueron infectadas con BCG (24 h.) o con sobrenadantes de células previamente infectadas con BCG (24 h.).

### *M. BOVIS* BCG INDUCE LA SECRECIÓN DE IL-10 EN CELULAS THP-1 DE MANERA DEPENDIENTE DE LA VÍA DE SYK.

Para evaluar si las células THP-1 secretan IL-10 al ser infectados con *M. bovis* BCG, realizamos un ELISA con los sobrenadantes de macrófagos infectados con la BCG o estimulados con extracto de levadura (*saccharomyces cerevisiae*) durante 16 y 24 h. Observamos que la exposición a extracto de la levadura induce la producción de IL-10 en los sobrenadantes a partir de las 16 h. (Figura 14 A), aunque a este tiempo las diferencias no son estadísticamente significativas con respecto a los niveles de IL-10

detectados en las células no estimuladas. Sin embargo, a las 24 h. las concentración de IL-10 aumentaron, tanto en respuesta a BCG como a los extractos de levaduras en comparación los niveles de las células sin estimular (Figura 14 A).

Al inhibir la cinasa SYK con BAY69, los niveles de IL-10 disminuyeron significativamente a las 24 h (Figura 14B), de manera sorpresiva encontramos que al inhibir a JAK con Whi-P131 no tuvo efectos significativos en la producción de IL-10 (Figura 14 B). Estos datos sugieren que SYK juega un papel importante en la secreción de IL-10 en la infección con *M. bovis* BCG.



**Figura 14.- La cinasa SYK es necesaria para la producción de IL-10 al infectar de células THP-1 con BCG.** A) Concentración de IL-10 en sobrenadantes de 100 000 células THP-1 en suspensión, estimuladas durante 16 h y 24h. con *M. bovis* BCG (M.O.I. 3) y extracto de levadura (*saccharomyces cerevisiae* 1mg/ml como control positivo) B) Concentración de IL-10 en sobrenadantes de 100 000 células THP-1 en suspensión, estimuladas durante 16 h y 24h. con *M. bovis* BCG pre tratadas con BAY61-3606 (10µm) y Whi-p131 (50µmm). En las gráficas se muestran los niveles relativos de la actividad de la luciferasa, así como la media ± la desviación estándar (n=3). \* P<0.05 \*\* P<0.01(ANOVA de una vía).

## DISCUSIÓN

*M tuberculosis* es el agente infeccioso que más personas ha matado en la historia, por lo que representa un gran problema de salud mundial. La organización mundial de la salud estima que cada año se infectan 1.5 millones de personas. Además, se calcula que alrededor de un tercio de la población está infectada con el bacilo. Sin embargo, solo 5-10% de este porcentaje de personas infectadas desarrollará la enfermedad activa. A pesar de que hay una vacuna contra el bacilo, hay un alto riesgo de infección ya que la eficiencia de esta es de un 60-70% (WHO 2015\*).

Como se mencionó previamente, existen medicamentos para combatir a este patógeno que muestran ser bastante efectivos. Lamentablemente estos tratamientos son muy largos, provocando que las personas eventualmente detengan el tratamiento, debido al mal uso de los antibióticos han surgido cepas multi-resistente (Stagg et al., 2016). Lo que ha intensificado el desarrollo de nuevos tratamientos. Sin embargo, en tanto los blancos terapéuticos sean moléculas bacterianas, siempre existirá la posibilidad de generar cepas resistentes. A lo largo de años de investigación se han elucidado los mecanismos de infección, identificado las moléculas que determinan la interacción bacteria –hospedero, además de la caracterización de la respuesta inmune contra la bacteria y como está la manipula para establecer una infección exitosa. En conjunto esta información ha permitido identificar moléculas del macrófago como posibles blanco terapéuticos para promover la destrucción de la bacteria por el sistema inmune.

En este trabajo tratamos de elucidar uno de los mecanismos que tiene la bacteria, para promover su propia sobrevivencia en el macrófago y mantener la infección activa. Una estrategia que el bacilo utiliza es, la de inducir la expresión de citocinas anti-inflamatorias como TGF $\beta$  e IL-10. Se ha observado que en pacientes infectados con MTb, los niveles de estas citocinas están aumentados. Sin embargo al tratar a estos pacientes con medicamentos contra Mtb, los niveles de estas citocinas disminuyen de manera significativa (Almeida et al., 2009). Además, se ha reportado que las concentraciones TGF $\beta$  e IL-10 se encuentran aumentados en personas con VIH+ y MTb en comparación con aquellas personas que solo están infectadas con MTb (Patel et al., 2009).



El TGF $\beta$  e IL-10 juegan un papel importante en la infección por Mtb. Estas citocinas no solo inhiben a las citocinas pro-inflamatorias, también bloquean la formación del fagolisosoma, de esta forma la bacteria garantiza su supervivencia una vez fagocitada (O'leary et al 2010). Es por eso que, investigamos los mecanismos moleculares mediante los cuales *M. tuberculosis* estimula la producción de IL-10 en macrófagos. Ya previamente se había descrito que el promotor de IL-10 tiene sitios de unión al factor de transcripción STAT3 y que éste, regula positivamente la expresión de la citocina (Schaefer et al., 2009; Werner et al., 2015), sin embargo, estos resultados se obtuvieron en un modelo de células B en respuesta a LPS e IFN $\gamma$ . En el 2010 O'leary y col. habían observado que *M. tuberculosis* induce la fosforilación de STAT3 a los 30 min. después de la infección de macrófago THP-1. En cambio, nuestros resultados indican que BCG induce la fosforilación de STAT3 desde los primeros 15 minutos después de la infección, a pesar de que las células THP1-1 presentan niveles basales de fosforilación de STAT3, lo cual es consistente con observación hechas por otros grupos de investigación (Martínez-Neri et al., 2015; O'Leary et al., 2011).

Si bien, Schaefer y col, (2009) habían demostrado que la unión de STAT3 a la secuencia localizada en el sitio -120 del inicio de la transcripción del gen de *IL-10* promueve la actividad transcripcional del gen de *IL-10* en respuesta a LPS y IFN $\gamma$ , se desconocía si STAT3 al interactuar con este sitio promueve la expresión de IL-10 en respuesta a *M. bovis* BCG.

Aquí mostramos que en respuesta a la infección con *M. bovis* BCG se induce la actividad transcripcional de STAT3 ya que al clonar en tándem 3 sitios de unión para STAT3 le confieren actividad transcripcional al promotor de la TK en respuesta a la infección de células THP-1 con *M. bovis* BCG. Esta actividad se pierde cuando se mutan las bases que determinan la interacción de STAT3 con su secuencia de unión (Werner et al., 2015). De acuerdo con los datos publicados por Zhang y col. (2009) que muestran que la producción de IL-10 en respuesta a la infección con Mtb depende de la activación de la cinasa SYK, al inhibir a SYK con Bay 61-3606 se previene la actividad transcripcional de STAT3. Esto sugiere que SYK regula positivamente la actividad transcripcional de STAT3 en macrófagos en respuesta a la infección con mycobacterias. Esto es congruente con resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que al inhibir la cinasa SYK, la fosforilación de STAT3 resultante de la infección de macrófagos con BCG disminuye (Villaseñor-Toledo 2013 manuscrito en preparación). Por otra parte, el hecho de que al inhibir a JAK también se observe una disminución de

la actividad transcripcional de STAT3 en células THP-1 infectadas con *M. bovis* BCG, indica que ambas vías pueden promover la actividad de STAT3 en respuesta a la mycobacteria (Martínez-Neri et al., 2015). De acuerdo con esto, la activación del promotor de *IL-10* en respuesta a la infección con *M. bovis* BCG también depende de STAT3, ya que nuestros resultados indican que cuando se elimina el sitio de unión de STAT3 localizado en la posición -120 con respecto al inicio de la transcripción del gen de *IL-10*, se abate la actividad de luciferasa resultante de la infección con *M. bovis* BCG. Adicionalmente, la actividad del promotor del gen de *IL-10* también se disminuye cuando se inhiben las cinasas SYK y JAK. Esto parece ser el resultado de la interacción del monocito con la mycobacteria, y no al efecto de las citocinas secretadas en el transcurso de la infección, que por un mecanismo autócrino podría estar activando a STAT3, como se ha descrito para IL-6 (Stumhofer et al., 2007). Ya que resultados preliminares indican que los sobrenadantes de células THP-1 infectadas con *M. bovis* BCG por 24 h. no promueve la actividad transcripcional del promotor de *IL-10*. En conjunto, estos resultados indican que en respuesta a la interacción de *M. bovis* BCG con las células THP-1 se activan las vías de SYK y JAK que resultan en la fosforilación y activación de STAT3, el cual al unirse al sitio -120 del promotor del gene humano de *IL-10* induce su actividad transcripcional y la expresión de IL-10.

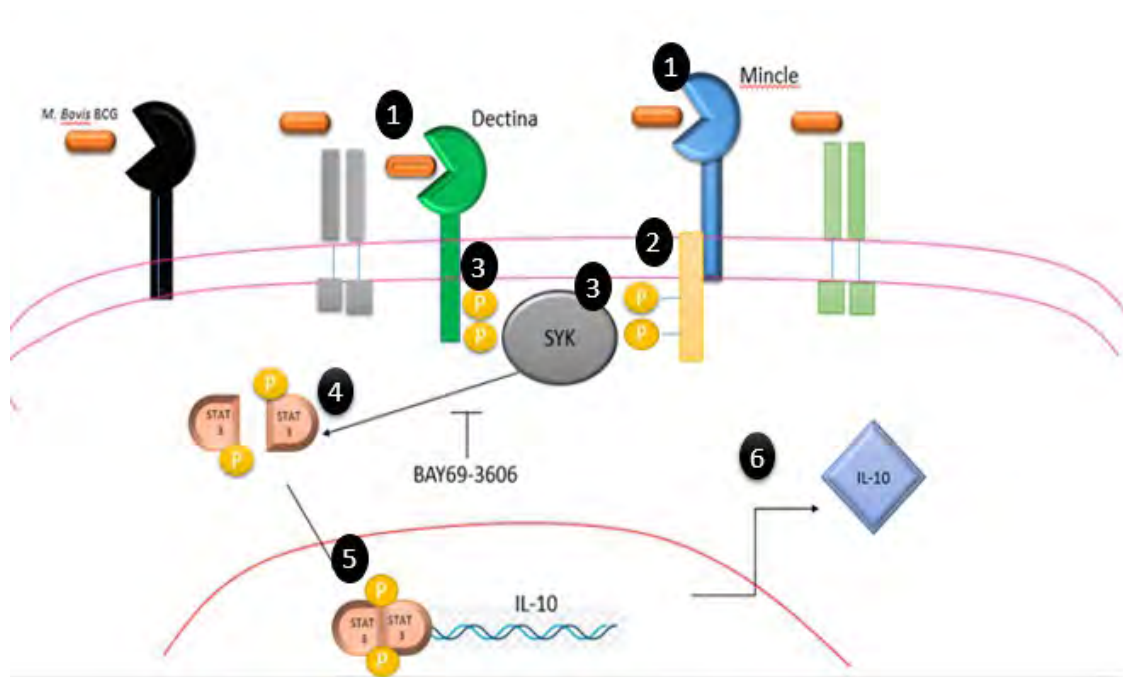
En cuanto a la producción de IL-10, nuestros datos son congruentes con resultados publicados previamente, ya que encontramos que la infección de los macrófagos THP-1 con *M. bovis* BCG promueven una modesta producción de IL-10 (80pg/ml) en comparación con la cepa HR37v la cual es la cepas más virulenta y por tanto inducen una mayor producción de IL-10 (200pg/ml) (Keane et al., 2000). Interesantemente y contrario a los datos de la actividad transcripcional del promotor de IL-10, encontramos que la producción de IL-10 en respuesta a la infección de las células THP-1 con *M. ovis* BCG depende de la activación de la vía de SYK mas que de la vía de JAK. Ya que al inhibir la vía de SYK (Bay 69-3606), pero no la vía de JAK(Whi-p131), los niveles de IL-10 disminuían considerablemente en sobrenadantes de monocitos THP-1 estimulados con *M. bovis* BCG. Este resultado es contrario a lo reportado por Martínez-Neri y col, (2015) que indica que la vía de JAK es la responsable de inducir la producción de IL-10. Sin embargo, cabe destacar que en ese estudio se utilizaron extractos proteicos filtrados de *M. bovis* (cepa virulenta), lo cual podría inducir una respuesta diferente o exacerbada de la producción de IL-10 a la que genera la bacteria completa a las MOIs con las que infectamos los monocitos. De

cualquier manera, consideramos que la respuesta inducida por la bacteria completa es una respuesta más cercana a la realidad que el uso de extractos. También hay que añadir que en ese estudio utilizaron un inhibidor diferente al que nosotros utilizamos, AG490 es un inhibidor más general de la vía de JAK/STAT que inhibe tanto a JAK1 como a JAK2, en tanto que Whi-P131 inhibe preferentemente a JAK2, por lo que no podemos descartar la participación de JAK1 en la fosforilación de STAT3 inducida *M. bovis* BCG. Independientemente de esto, se ha reportado que la proteína TTP (Trisitetrapolina) juega un papel crucial en la estabilidad del mensajero de IL-10, pues en ausencia de esta proteína la estabilidad del mensajero decae drásticamente (Chrestensen et al., 2004) y que TTP es activada por MK2, una cinasa que se sabe, está río abajo en la vía de señalización de SYK (Iyer and Cheng, 2012). Por lo tanto al inhibir a SYK, además de inhibir la expresión de IL-10, también se disminuye la vida media del RNAm de IL-10 y por tanto la cantidad de proteína. En este trabajo, no revisamos particularmente cuales podrían ser los receptores que reconocen a la BCG y que desencadenan la activación de STAT3 y por ende la producción de IL-10. Sin embargo se sabe que el receptor Mincle (macrophages-inducible C-type lectin), se acopla a la cadena  $\gamma$  de los receptores FC, la cual al ser fosforilada por algún miembro de la familia de las cinasas SRC, se genera un sitio de andamiaje para SYK y de esta forma se fosforila y se activa, este proceso se ha observado descrito ampliamente en respuesta a diferentes ligandos (Marakalala et al., 2010). De manera interesante se describió que *M. bovis* BCG es reconocida por Mincle desencadenando la vía antes descrita y promoviendo la expresión de IL-10. Cabe destacar que anteriormente, se desconocía cual era la proteína intermedia que pudiera servir como factor transcripcional. (Patin et al., 2016)

Por otra parte se ha descrito que el receptor de Dectina es capaz de reconocer la pared de *M. bovis*, activar a SYK y promover la expresión de IL-10 (Elcombe et al., 2013; Marakalala et al., 2010)

Tomando en cuenta nuestros resultados y con base en la literatura, proponemos el siguiente modelo:

*M. bovis* BCG es reconocida por Mincle o Dectina (1) e induce su asociación con la cadena  $\gamma$  del receptor FC (2) el cual recluta a SYK (3). Ya que SYK es fosforilado recluta a STAT3 (4) y lo fosforila. STAT3 al ser fosforilado se dimeriza con otro STAT3 fosforilado y se transloca al núcleo (5), lugar donde se une al promotor de IL-10 promoviendo su transcripción y finalmente su traducción (6).



## CONCLUSIÓN

En la infección con *M. bovis* BCG al macrófago, STAT3 interacciona con el promotor de *IL-10* promoviendo así, su transcripción. Sin embargo es necesario que SYK se encuentre activo para que la transcripción y traducción se lleve a cabo.

Estos resultados nos abren un panorama en el área clínica, ya que al conocer la importancia que tiene SYK y STAT3 en la infección de *M. bovis* BCG, se pueden emplear fármacos, que tenga como blanco específico, la inhibición de estas proteínas, lo que provocaría que en pacientes que estén infectado con Mtb y que hayan desarrollado la enfermedad, los niveles de IL-10 disminuyan, provocando que haya una reactivación del sistema inmune y de esta forma, pueda ser controlada la enfermedad, sin el riesgo de generar resistencia a antibióticos. Sin embargo es necesario hacer más pruebas en laboratorio para que esto sea empelado en el área clínica.

## REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, Roberts, K. and Walter, P. (2004). *Biología molecular de la célula*. 5ª Edición. Editorial Omega. Barcelona, España. Pp:831-884
- Armstrong, B. Y. J. A., & Hart, A. P. D. A. (1971). From the National Institute for Medical Research, London, NW7, England its growth within these cells is relatively slow.
- Almeida, a. S., Lago, P.M., Boechat, N., Huard, R.C., Lazzarini, L.C.O., Santos, a. R., Nociari, M., Zhu, H., Perez-Sweeney, B.M., Bang, H., et al. (2009). Tuberculosis Is Associated with a Down-Modulatory Lung Immune Response That Impairs Th1-Type Immunity. *J. Immunol.* 183, 718–731.
- Aung, H., Sherman, J., Tary-lehman, M., and Toossi, Z. (2002). Analysis of transforming growth factor-beta 1  $\beta$  1 / expression in human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* at a single cell level by ELISPOT assay. 25–32.
- Bogdan, B.C., Vodovotz, Y., and Nathan, C. (1991). *J. Immunol.* 174.
- Chrestensen, C. a., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pelo, J.W., Worthington, M.T., and Sturgill, T.W. (2004). MAPKAP Kinase 2 Phosphorylates Tristetraprolin on in Vivo Sites Including Ser178, a Site Required for 14-3-3 Binding. *J. Biol. Chem.* 279, 10176–10184.
- Chung, J., Uchida, E., Grammer, T.C., and Blenis, J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6508–6516.
- Crouch E, Wright J, M.M., Disease, M., Dentistry, H., and Hall, S. (2001). Surfactant Proteins A and D and Pulmonary Host Defense. *Annu. Rev. Physiol.* 89–99.
- Dannenberga, M.J., and Rook, G.W. a (1994). Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune response—dual mechanisms that control bacillary multiplication. *Tuberc. Pathog. Prot. Control* 459–483.
- Das, S., Banerjee, S., Majumder, S., Paul Chowdhury, B., Goswami, A., Halder, K., Chakraborty, U., Pal, N.K., and Majumdar, S. (2014). Immune Subversion by *Mycobacterium tuberculosis* through CCR5 Mediated Signaling: Involvement of IL-10. *PLoS One* 9, e92477.
- Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628–2637.

Elcombe, S.E., Naqvi, S., Van Den Bosch, M.W.M., MacKenzie, K.F., Cianfanelli, F., Brown, G.D., and Arthur, J.S.C. (2013). Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes the Induction of Regulatory Macrophage Markers. *PLoS One* 8.

Fratazzi, C., Manjunath, N., Arbeit, R.D., Carini, C., Gerken, T. a, Ardman, B., Remold-O'Donnell, E., and Remold, H.G. (2000). A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. *J. Exp. Med.* 192, 183–192.

Fulton, S. a, Reba, S.M., Pai, R.K., Torres, M., Harding, C. V, Henry, W., Pennini, M., and Boom, W.H. (2004). Inhibition of Major Histocompatibility Complex II Expression and Antigen Processing in Murine Alveolar Macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-Kilodalton Mycobacterial Lipoprotein Inhibition of Major Histocompatibility Complex II Expression and . 72, 2101–2110.

Ghorpade, D.S., Leyland, R., Kurowska-Stolarska, M., Patil, S. a., and Balaji, K.N. (2012). MicroRNA-155 Is Required for *Mycobacterium bovis* BCG-Mediated Apoptosis of Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2239–2253.

Gong, J.H., Zhang, M., Modlin, R.L., Linsley, P.S., Iyer, D., Lin, Y., and Barnes, P.F. (1996). Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect. Immun.* 64, 913–918.

Hernández-Pando, R., Orozco-Esteves, H., Maldonado, H. a., Aguilar-León, D., Vilchis-Landeros, M.M., Mata-Espinosa, D. a., Mendoza, V., and López-Casillas, F. (2006). A combination of a transforming growth factor- $\beta$  antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 144, 264–272.

Hirsch, C.S., Toossi, Z., Othieno, C., Johnson, J.L., Schwander, S.K., Robertson, S., Wallis, R.S., Edmonds, K., Okwera, a, Mugerwa, R., et al. (1999). Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J. Infect. Dis.* 180, 2069–2073.

Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 25, 496–502.

Iyer, S.S., and Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 23–63.

Keane, J., Remold, H.G., and Kornfeld, H. (2000). Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.* 164, 2016–2020.

Marakalala, M.J., Graham, L.M., and Brown, G.D. (2010). The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin. Dev. Immunol.* 2010, 567571.

Marakalala, M.J., Guler, R., Matika, L., Murray, G., Jacobs, M., Brombacher, F., Rothfuchs, A.G., Sher, A., and Brown, G.D. (2011). The Syk/CARD9-coupled receptor Dectin-1 is not required for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Microbes Infect.* *13*, 198–201.

Martínez-Neri, P. a., López-Rincón, G., Mancilla-Jiménez, R., del Toro-Arreola, S., Muñoz-Valle, J.F., Fafutis-Morris, M., Bueno-Topete, M.R., Estrada-Chávez, C., and Pereira-Suárez, A.L. (2015). Prolactin modulates cytokine production induced by culture filtrate proteins of *M. bovis* through different signaling mechanisms in THP1 cells. *Cytokine* *71*, 38–44.

Moore, K.W., Malefyt, R.D.W., Robert, L., and Garra, A.O. (2001). Interleukin -10 and the Interleukin -10. *Mol. Cell. Biol.* *1*, 683–765.

Murray, P.J., and Wynn, T. a (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.

Nagabhushanam, V., Solache, a, Ting, L.M., Escaron, C.J., Zhang, J.Y., and Ernst, J.D. (2003). Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol* *171*, 4750–4757.

O’Leary, S., O’Sullivan, M.P., and Keane, J. (2011). IL-10 blocks phagosome maturation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 172–180.

O’Shea, J.J., and Murray, P.J. (2008). Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity* *28*, 477–487.

Pasula, R., Downing, J.F., Wright, J.R., Kachel, D.L., Davis, T.E., and Martin, W.J. (1997). Surfactant Protein A (SP-A) Mediates Attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to Murine Alveolar Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *17*, 209–217.

Patel, A.K., Thakrar, S.J., and Ghanchi, F.D. (2011). Clinical and laboratory profile of patients with TB/HIV coinfection: A case series of 50 patients. *Lung India* *28*, 93–96.

Patel, N.R., Swan, K., Li, X., Tachado, S.D., and Koziel, H. (2009). Impaired *M. tuberculosis*-mediated apoptosis in alveolar macrophages from HIV+ persons: potential role of IL-10 and BCL-3. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 53–60.

Patin, E.C., Willcocks, S., Orr, S., Ward, T.H., Lang, R., and Schaible, U.E. (2016). Mincle-mediated anti-inflammatory IL-10 response counter-regulates IL-12 in vitro. *Innate Immun.* *22*, 181–185.

Peterson, P.K., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Anderson, W.R., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., Gustafson, K. V., Molitor, T.W., and Chao, C.C. (1995). CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect. Immun.* *63*, 1598–1602.

Quesenberry P, Colvin G. Hematopoietic Stem Cells, progenitor cells and cytokines. En: Hematology. Beutler E, Marshall S, Collier B, Kipps T, Seligsohn M. Mc Graw Hill, 2001, pp153•

Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 352–366.

Rosenzweig, S.D., and Holland, S.M. (2005). Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol. Rev.* 203, 38–47.

Schaefer, A., Unterberger, C., Frankenberger, M., Lohrum, M., Staples, K.J., Werner, T., Stunnenberg, H., and Ziegler-Heitbrock, L. (2009). Mechanism of interferon-gamma mediated down-regulation of interleukin-10 gene expression. *Mol. Immunol.* 46, 1351–1359.

Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R., and Horwitz, M. a (1990). Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* 144, 2771–2780.

Sendide, K., Deghmane, A.-E., Pechkovsky, D., Av-Gay, Y., Talal, A., and Hmama, Z. (2005). Mycobacterium bovis BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10-dependent inhibition of cathepsin S. *J. Immunol.* 175, 5324–5332.

Shuai, K., and Liu, B. (2003a). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 900–911.

Shuai, K., and Liu, B. (2003b). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 900–911.

Stagg, H.R., Harris, R.J., Hatherell, H., Obach, D., Zhao, H., Tsuchiya, N., Kranzer, K., Nikolayevskyy, V., Kim, J., Lipman, M.C., et al. (2016). What are the most efficacious treatment regimens for isoniazid-resistant tuberculosis? A systematic review and network meta-analysis. *Thorax thoraxjnl* – 2015–208262.

Uckun, F.M., Qazi, S., Ma, H., Tuel-Ahlgren, L., and Ozer, Z. (2010). STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2902–2907.

Werner, T., Frankenberger, M., Benkhart, E., Ziegler-Heitbrock, L., Lötzerich, M., and Schaefer, A. (2015). Stat3 and Recruiting Both IFN Regulatory Factor 1 Induces the Human IL-10 Gene by  $\alpha$  IFN- IFN- $\gamma$  Induces the Human IL-10 Gene by Recruiting Both IFN Regulatory Factor 1 and Stat3. *J Immunol Ref.* 171, 285–290.

(WHO), W. H. O. (2015) Tuberculosis Report. (\*pp.13-18). (\*\*pp.55-61)

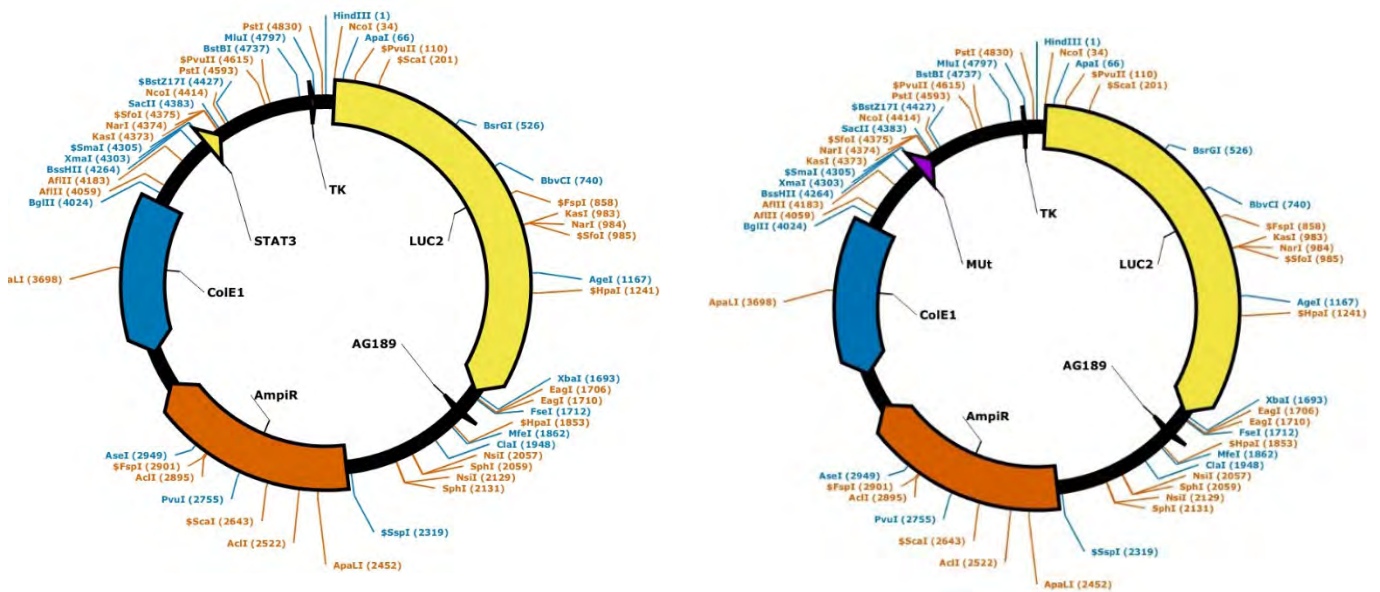


Yadav, M., Clark, L., and Schorey, J.S. (2006). Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* *176*, 5494–5503.

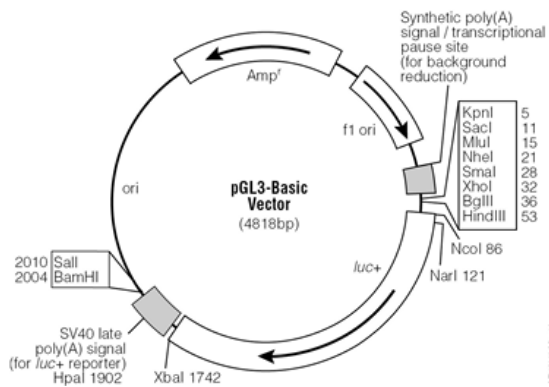
Zhou, Z., Gushiken, F.C., Bolgiano, D., Salsbery, B.J., Aghakasiri, N., Jing, N., Wu, X., Vijayan, K.V., Rumbaut, R.E., Adachi, R., et al. (2013). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced Platelet aggregation independently of its transcription factor activity. *Circulation* *127*, 476–485.

Zimmerli, S., Edward, S., Ernst, J. (1996). Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 15, No. 6 (1996), pp. 760-70

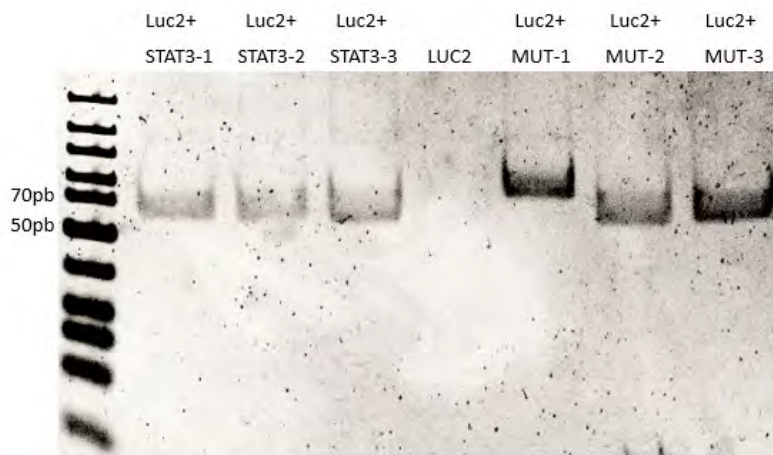
# ANEXO



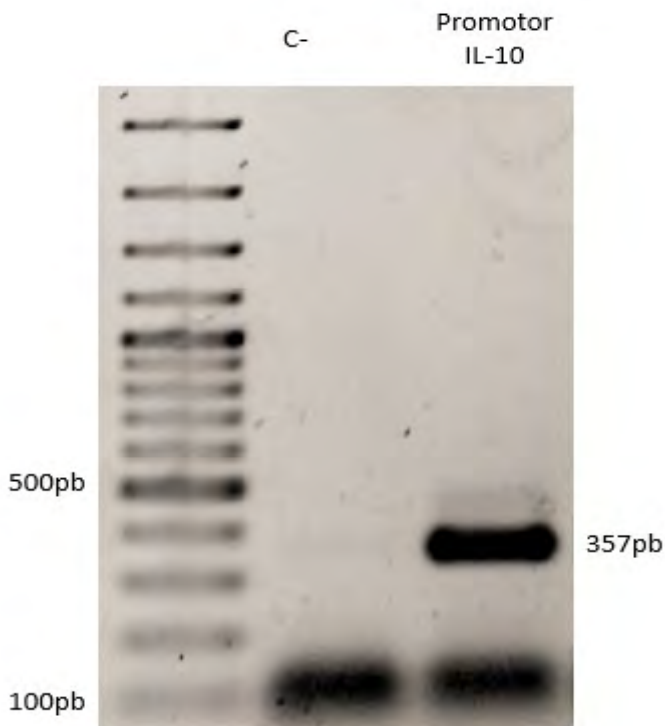
**Figura suplementaria 1.- Vectores STAT3-TK-LUC y STAT3mut-TK-LUC.**: Mapas de los vectores STAT3-TK-LUC A) y STAT3mut-TK-LUC Luc-2 B) Los cuales tienen el promotor mínimo de TK río abajo del sitio de clonado múltiple, este vector le proporciona resistencia a ampicilina y tiene el gen que codifica la Luciferasa.



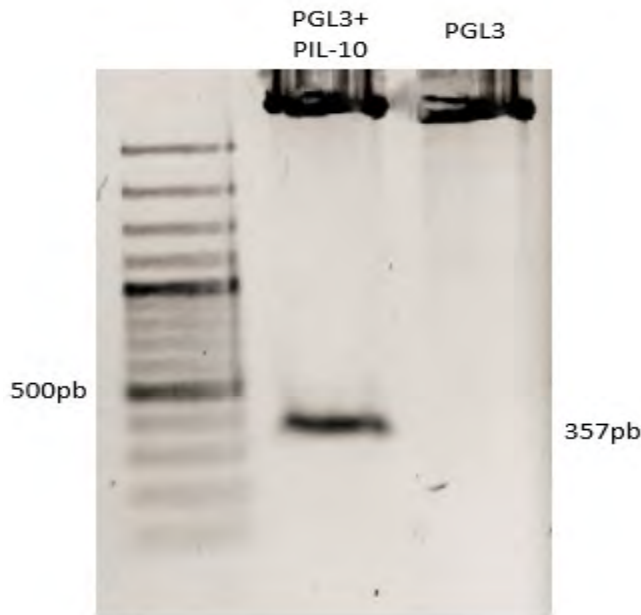
**Figura suplementaria 2.- pGL3 basic vector.** Es un vector sin promotor previo al gen que codifica para luciferasa, que proporciona resistencia a ampicilina.



**Figura suplementaria 3.- Construcción del vector STAT3-TK-LUC y STAT3mut-TK-Luc:**  
 Gel de acrilamida al 10% donde se observan los fragmentos del sitio consenso de STAT3 y del sitio mutante,. El vector fue digerido con *XmaI* y liberó los fragmentos de 68pb, como control negativo se utilizó el vector Luc-2 vacío digerido con *XmaI*



**Figura suplementaria 4.- Amplificación del promotor de IL-10.** Gel de agarosa al 1%, en donde se muestra una banda de 357 pb. que corresponden a la amplificación por PCR del Fragmento del promotor de *IL-10*. Como control negativo se utilizó una muestra sin templado



**Figura suplementaria 5.- Digestión diagnóstica de la construcción: PGL3 PIL-10 del vector PGL3.** Gel de agarosa al 1% En donde se muestra la liberación del promotor de *IL-10* (357 pb) del vector PGL3-PIL10, el cual fue digerido con las enzimas *Xho1* y *HindIII*. Como control negativo se utilizó PGL3 vacío digerido con las mismas enzimas.

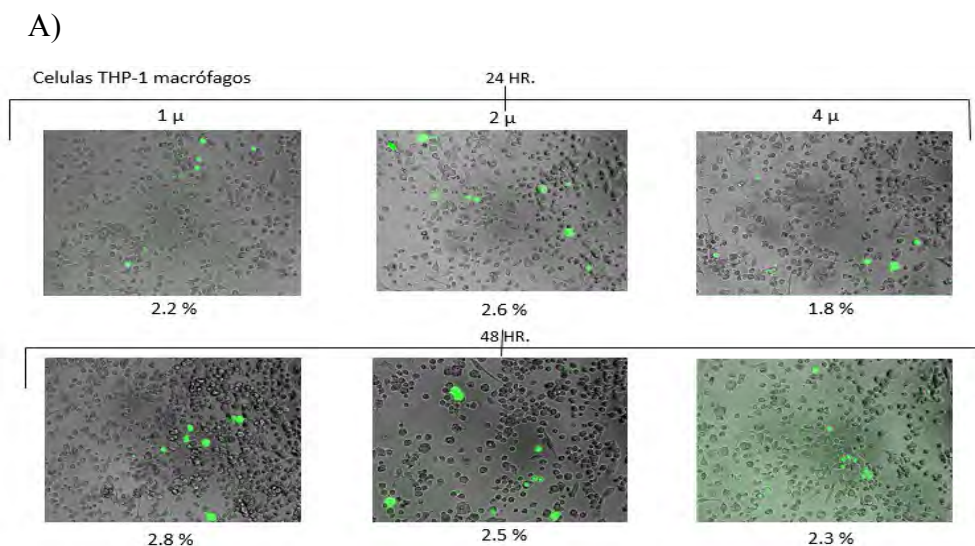
## ESTANDARIZACIÓN DE TRANSFECCION DE CÉLULAS THP-1 Y RAW BLUE

Para poder realizar los experimentos de luciferasa fue necesario optimizar el protocolo de transfección para las THP-1. Debido a que, estas células resultan difíciles de transfectar tuvimos que probar diferentes metodologías, para determinar cuál de todas confiere mayor eficiencia de transfección.

Primero se utilizó lipofectamina y se probaron diferentes concentraciones de plásmido pSUPER, el cual expresa la proteína verde fluorescente GFP, cuando se analizaron las células, observamos que la tasa de transfección fue muy baja, de aproximadamente 2.8% independientemente de la concentración de DNA (Figura suplementaria 4). Debido a la baja eficiencia de transfección en las THP-1, se procedió a transfectar células Raw blue. Sin embargo la eficiencia de transfección fue aun menor que las THP-1.

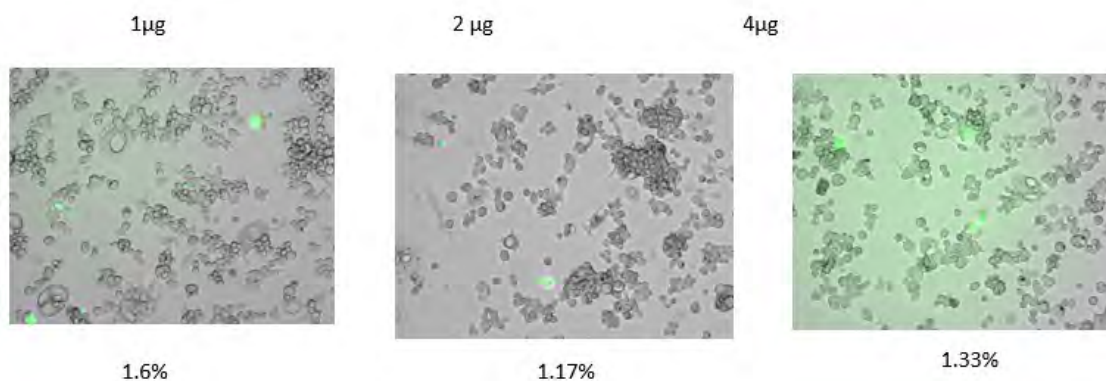
Debido a la baja eficiencia de transfección que se observó con esta metodología, se procedió a transfectarlas mediante electroporación utilizando el nucleoporador (Amaxa), utilizando PBS y una solución de nucleofector como amortiguadores para el choque eléctrico, posteriormente las células fueron analizadas por citometría de flujo, primeramente se utilizó el programa para monocitos utilizando PB y nucleofector como amortiguadores, observando una viabilidad celular del 6% y una eficiencia del 0%

(Información no mostrada). Posteriormente se realizó otro experimento utilizando 2 programas específicos para la transfección de la líneas THP-1 (alta viabilidad y alta eficiencia) y siendo cosechadas a las 24 (Figura suplementaria 5 A) y 48 h. (Figura suplementaria 5 B). A las 48 h. se observó que las células emitieron más florescencia que a las 24h., de manera interesante pudimos observar que a este tiempo, el programa que mostro más eficiencia de transfección fue el de alta eficiencia (con PBS y con nucleofector), alcanzando hasta un 53% de eficiencia,(Figura suplementaria 5) sin embargo, de esta forma se comprometía bastante la viabilidad celular , por lo que se optó por la metodología en la cual se mantuviera la viabilidad y se obtuviera una eficiencia mayor al 10% siendo así, se eligió utilizar el nucleofector y utilizando el programa de alta viabilidad para células THP-1.



B)

Celulas Raw blue

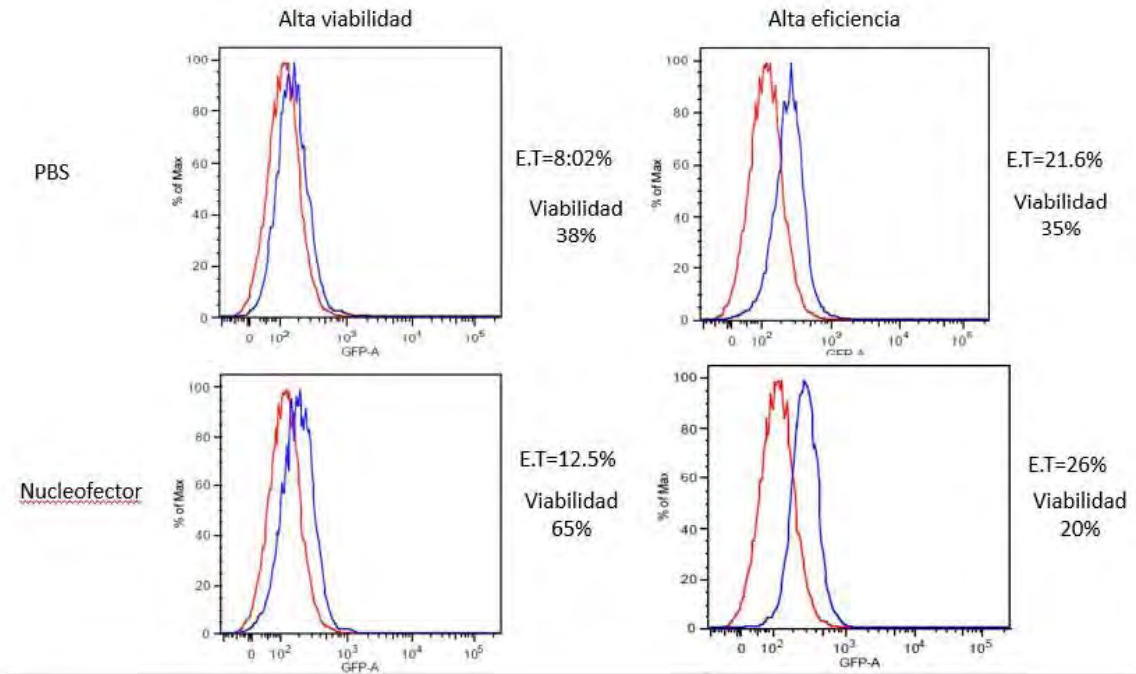


**Figura suplementaria 6.-Transfección de macrófagos THP-1 y células RAW blue. A)**

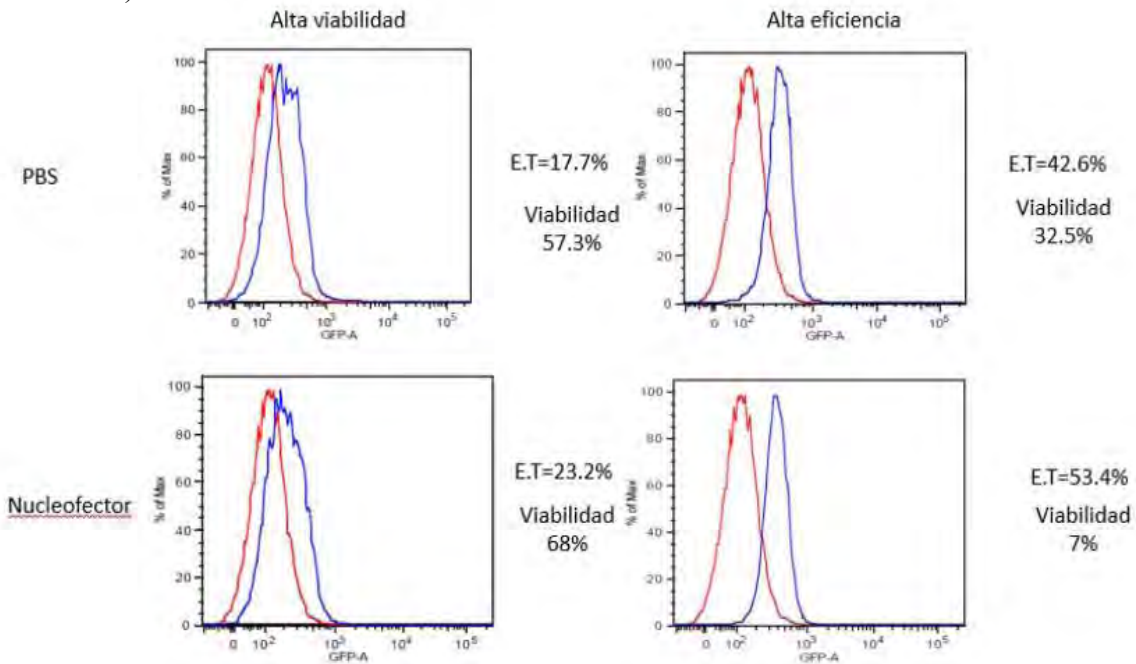
Macrófagos diferenciados a partir de células THP-1, transfectadas con 1, 2 y 4  $\mu$ g con el vector P-super,

las células fueron observadas 24 y 48 h. después de la transfección. B) Macrófagos Raw blue, estas células fueron transfectadas con 1, 2 y 4µg con el vector pSUPER, se observaron 48 h. después de la transfecciones

A)



B)



**Figura suplementaria 7.-Transfección de células THP-1.** Células THP-1 transfectadas con 1µg del vector Psuper. En la parte superior de cada panel se utilizó PBS como amortiguador de la transfección y en la parte inferior se utilizó nucleofector. Las parte izquierda, corresponde a células transfectadas usando el programa de alta viabilidad y la derecha, células transfectadas utilizando el programa de alta eficiencia A) células fijadas a las 24h. B) células fijadas a las 48

# APÉNDICE

Western Blot

Buffer corrida:

Reactivo	Concentración
GLICINA	1.92 M
SDS	1%
TRIS	0.25 M

Buffer de Transferencia

Reactivo	Concentración
GLICINA	200 mM
TRIS	25 mM
Metanol	20%

**lisis alcalina**

Solución 1:

Reactivo	Concentración
EDT	10mM
Glucosa	10 mM
Tris-HCL pH 8	25 mM

Solución 2:

Reactivo	Concentración
NaOH	10 N
SDS	10%

Solución 3:

Reactivo	Concentración
Acetato de potasio	5 M
Ácido Acético Glacial	5 ml

Guardar a 4°C las soluciones 1 y 3 la solución 2 se prepara al momento de que se requiera ocupar.

Soluciones Extractos nucleares

Buffer A

Reactivo	Concentración
HEPES pH 7.6	10mM
KCL	10mM
EDTA	0.1 mM
Esper	0.75



midina	mM	
Esper	0.15	
mina	mM	

Al stock agregarles los siguientes inhibidores

NLB

Reac	Concent
PMSF	0.5 mM
Aprot	2mg/ml
Leupe	2ug/ml
Pesta	2 ug/ml
Na2	10 mM
DTT	1 mM

Nucleofector :

Reac	Concentr
PBS	
CaCl	1mM
MG	1 mM
Hep	1 M
Gluc	1 M
Man	1M

R	Concentraci
NaC	0.4 M
EDT	1mM
EGT	1 mM
Hep	20 mM

## Abreviaturas

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis, Mtb</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>M. bovis</i>
Bacillus Calmette Guerin	BCG
Cinasa Janus	JAK
Signal Transducer and activator of transcription	STAT
Interferón	IFN
Factor de Necrosis tumoral	TNF
Interleucina	IL
Minuto	Min
Hora	h
Albumina sérica bovina	BSA
Receptor del Complemento	CR
Segundo	s
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Mini preparación	Miniprep
Asesina Natural	NK
Celula cooperadora	TH
Diacilglicerol	DAG
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Solucion amortiguadora de Fosfatos	PBS
Revoluciones por minuto	RPM
Suero fetal Bovino	SFB
Forbol 12-miristato 13 acetato	TPA
Virus de Inmunodeficiencia Adquirida	VIH

