



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

El Papel del Factor Transcripcional Klf10 en el Desarrollo de la Tuberculosis

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Edgardo Madrid Paulino

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Viviana Valadez Graham ((Instituto de Biotecnología-UNAM  
Dr. Rogelio Hernández Pando (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán)

Cuernavaca Morelos, Enero 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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 a los financiamientos de CONACyT IFC2016-2282t/FonInst./58/2016/CF2019-40792 y por DGAPA-UNAM/PAPIIT IN213119/IN215119. Y al apoyo de beca de Doctorado CONACyT: 448043

## **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 por sus comentarios y sugerencias que fueron valiosos para el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Rogelio Hernández Pando por permitirme desarrollar mi proyecto en su laboratorio y facilitarme un espacio y sus recursos, a la Dra. Dulce Mata por ayudarme en todo el proceso de infección y conocimiento para poder trabajar en un laboratorio con facilidades Bsl3.

Al técnico Oswaldo López Gutiérrez por su ayuda técnica, sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto

Al técnico Tomas Villaseñor Toledo por su asistencia y ayuda para el desarrollo y conclusión de este proyecto

A Sol, por su ayuda directa para la elaboración de este proyecto. Y en general a los demás miembros del NIB

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 y Bodo por que con su sonrisa me motivaba cada día.

A Ale por todo el soporte, cariño y cuidado que me ha dado a lo largo de estos últimos años, siempre le estaré agradecido.

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.

## Abreviaturas:

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Macrófagos derivados de medula	MDM
Tuberculosis	TB
Factor de crecimiento transformante beta	TGF $\beta$
Wild Type	Wt
Intensidad de Fluorescencia media	IFM
Escherichia Coli	<i>E. coli</i>
Interferón gamma	IFN $\gamma$
Factor de Necrosis Tumoral	TNF
Interleucina	IL
Minuto	Min
Hora	h
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Suero fetal Bovino	SFB
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
Virus de Inmunodeficiencia Humana	VIH
Multidrogo-resistente	MDR
Lipopolisacáridos	LPS

## Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	3
<b>Abreviaturas:</b> .....	4
<b>Resumen</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
<b>Antecedentes</b> .....	10
<b>El sistema inmune juega un papel importante en el control de las infecciones</b> .....	10
<b>Infección del macrófago</b> .....	11
<b>El granuloma y la producción de Citocinas inflamatorias</b> .....	13
<b>Macropinocitosis</b> .....	14
<b>Justificación</b> .....	17
<b>Hipótesis</b> .....	18
<b>Objetivo general</b> .....	18
<b>Objetivos Particulares</b> .....	18
<b>Materiales y métodos</b> .....	18
<b>Anticuerpos</b> .....	18
<b>Reactivos</b> .....	19
<b>Animales</b> .....	19
<b>Líneas celulares</b> .....	19
<b>Macrófagos derivados de médula ósea (MDM)</b> .....	20
<b>Citometría de Flujo</b> .....	21
<b>Cultivos bacterianos</b> .....	21
<b>Ensayos de fagocitosis y destrucción.</b> .....	22
<b>Cálculo de la capacidad bactericida</b> .....	23
<b>Intercambio de sobrenadantes</b> .....	23
<b>Bloqueo de interferón</b> .....	24
<b>Inhibición de la macropinocitosis</b> .....	24
<b>ELISA</b> .....	24
<b>Microscopia electrónica de transmisión</b> .....	24
<b>Inmunofluorescencia anti-Coronina 1</b> .....	25

<b>Obtención de extractos proteicos y Western Blot.....</b>	<b>25</b>
<b>Infección del ratón.....</b>	<b>26</b>
<b>Determinación de la carga bacteriana pulmonar.....</b>	<b>26</b>
<b>Pacientes y procesamiento de muestras.....</b>	<b>26</b>
<b>Extracción de ARN y qPCR.....</b>	<b>27</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>Los macrófagos carentes de Klf10 presentan una mayor activación en respuesta a estímulos inflamatorios.....</b>	<b>29</b>
<b>La ausencia de Klf10 estimula una mayor capacidad fagocítica y destructiva.....</b>	<b>30</b>
<b>Los macrófagos <i>Klf10</i><sup>-/-</sup> son más eficientes destruyendo a <i>M. tuberculosis</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>La capacidad fagocítica y destructiva de los macrófagos <i>Klf10</i><sup>-/-</sup> es inducida por IFN<math>\gamma</math>.....</b>	<b>32</b>
<b>Los macrófagos <i>Klf10</i><sup>-/-</sup> cambian su mecanismo de internalización hacia la macropinocitosis.....</b>	<b>37</b>
<b>Los ratones <i>Klf10</i><sup>-/-</sup> son resistentes a la infección por <i>Mycobacterium</i>.....</b>	<b>41</b>
<b><i>M. tuberculosis</i> modula la expresión del gen <i>Klf10</i> en macrófagos infectados.....</b>	<b>42</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>44</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>50</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>51</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>52</b>

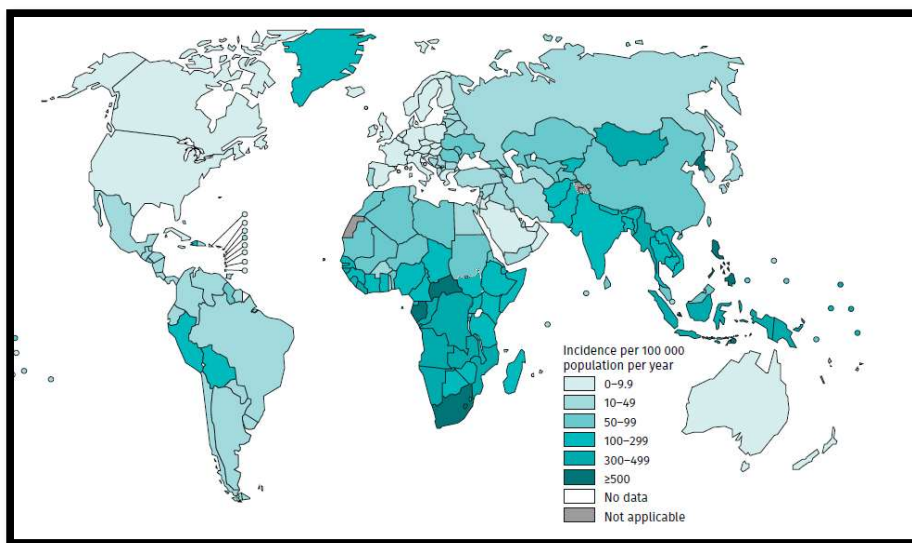
## Resumen

*Mycobacterium tuberculosis* ha desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir en el interior de células fagocíticas, como los macrófagos. La fagocitosis es un proceso clave para eliminar los patógenos invasores y se sabe que *M. tuberculosis* interrumpe eficientemente la maduración del fagosoma para asegurar la infección. Por otro lado, las citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos en respuesta a la infección temprana por *M. tuberculosis* son clave para promover la destrucción bacteriana. El IFN $\gamma$  y el TNF mejoran la absorción y destrucción de *M. tuberculosis* al cambiar el mecanismo de captura de los macrófagos, que cambia de la fagocitosis a macropinocitosis. En este trabajo, demostramos que el factor de transcripción Krüppel-like factor 10 (Klf10) modula negativamente los niveles de IFN $\gamma$  lo que favorece la sobrevivencia de *M. tuberculosis*. Los macrófagos deficientes en Klf10 producen más IFN $\gamma$  a niveles basales y tras la estimulación con *M. tuberculosis* que los macrófagos silvestres, lo que mejora la captación bacteriana y la actividad bactericida lograda por la macropinocitosis. Además, los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> mostraron una distribución citoplasmática de coronina 1 que se asoció con un mayor número y mayor longitud de los seudópodos. En concordancia con estas observaciones, los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> eliminaron eficientemente a *M. tuberculosis* de los pulmones y por tanto, presentaron una mayor sobrevivencia a la infección. En conjunto nuestros datos indican que Klf10 es un factor transcripcional que juega un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune, al inhibir la producción de IFN $\gamma$  en condiciones basales y disminuyendo la expresión de TNF e IL-6 en macrófagos cuando son tratado con estímulos inflamatorios. Bajos niveles de IFN $\gamma$  en el medio ocasionan que los macrófagos no puedan cambiar de fagocitosis a macropinocitosis, ocasionando que *M. tuberculosis* no pueda ser destruida de manera eficiente dentro de los macrófagos.



## Introducción

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis (TB). La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que suele afectar a los pulmones, pero también puede afectar otros órganos. Se transmite 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 *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, ya que el sistema inmunitario actúa eficientemente eliminando la bacteria o previniendo su diseminación formando una barrera alrededor de la misma. En 2019, la OMS informó que más de 10 millones de personas se infectaron con *M. tuberculosis* causando aproximadamente 1.6 millones de muertes en todo el mundo (Esquema 1) (WHO 2021).



Esquema 1.- **Incidencia de tuberculosis en el 2020.** En este mapa se muestran los casos de incidencia de tuberculosis mundial en el año 2020. En color verde se muestran los países en los cuales hubo casos nuevos de la enfermedad, donde a mayor intensidad del color mayor el número de casos de incidencia (WHO 2021).

Datos de la OMS sugieren que 1 de cada 3 personas en el mundo están infectadas con el patógeno, se estima que el 33% de persona infectadas puede controlar la infección de manera exitosa. Sin embargo, un número creciente de personas en el mundo contraen la tuberculosis debido a que su sistema inmunitario se ve comprometido por medicamentos inmunosupreso-

res, abuso de drogas, anemia, diabetes y principalmente por ser portadores del Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) por lo que puede llegar a ser letal si no se trata a tiempo (Jeremiah et al., 2022).

A pesar de ser una enfermedad que puede llegar a ser mortal y que cuenta con un gran número de incidencias anuales, puede ser tratada mediante el uso de fármacos antituberculosos, debido a su alta eficacia y bajo costo. Los fármacos de primera opción son: isoniazida y rifampicina. Sin embargo, el uso inadecuado de estos fármacos ha generado el surgimiento de cepas que son resistentes a isoniazida y rifampicina. A este tipo de cepas se le conoce como multidrogo-resistentes (MDR). Desafortunadamente también se ha detectado el surgimiento de cepas que son extensamente resistentes, no solo a los fármacos de primera línea sino que también a todas las fluoro quinonas y por lo menos a uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina) (Bogdan et al., 1991) Así, las opciones de tratamiento, para estas cepas son muy limitadas. Este tipo de cepas resistentes se encuentran distribuidos en los 92 países (principalmente en Europa) en los cuales se ha reportado la enfermedad (WHO 2021).

Algunos investigadores (Sánchez-Pérez, 2021) han reportado que, la situación en México no es alentadora, ya que en 2019 se registraron cerca de 22, 285 casos nuevos, de los cuales la mayoría se presentaron en población de 15 y más años (principalmente de 20-64 años). En cuanto a la incidencia de casos de cepas MDR, se calcula que, en México en el 2019, hubo aproximadamente 970 casos nuevos. Referente a la mortalidad, el número de fallecimientos por TB registrado en el año 2017 en el país fue de 2006, de los cuales 760 estaban infectado con VIH. Por lo tanto, es necesario un mayor esfuerzo en la investigación, para comprender los posibles mecanismos moleculares que ha adquirido *M. tuberculosis* para montar 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 *M. tuberculosis*.

## **Antecedentes**

### **El sistema inmune juega un papel importante en el control de las infecciones**

El sistema inmune surgió como un mecanismo de defensa contra agentes patógenos, reconocimiento y reparación del daño tisular, este ha evolucionado para proteger al huésped, en un universo de microorganismo que se encuentran en constante evolución. Algo destacable del sistema inmunitario es su capacidad de movilizar una respuesta ante un patógeno, toxina o agente invasor, gracias a su capacidad para distinguir lo propio de lo extraño (David., 2010).

El sistema inmune está constituido por dos tipos de respuestas: respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta inmune adaptativa comienza pocos días después de la infección inicial y se caracteriza por ser más específica, especializada y capaz de generar memoria contra el patógeno causante de la infección. La respuesta inmune innata puede incluir mecanismos moleculares y celulares que ya se encuentran en un individuo antes de la infección (Kind 2007)

Los macrófagos son células inmunitarias que desempeñan un papel clave en la activación de la inmunidad innata en respuesta a los patógenos invasores y al daño tisular. Sus funciones principales son engullir patógenos y células moribundas y causar inflamación (Wynn et al., 2013). La fagocitosis es un proceso endocítico, en el cual los macrófagos rodean partículas sólidas con sus membranas plasmáticas y las internalizan (Gordon, 2016). Este proceso está altamente regulado por diferentes receptores, como los receptores del complemento, los receptores tipo toll (TLR), scavengers y la molécula de adhesión intercelular específica de las células dendríticas-3 (DC-SIGN) (David and Caetano, 2015; Lugo-Villarino et al., 2018; Peterson et al., 1995).

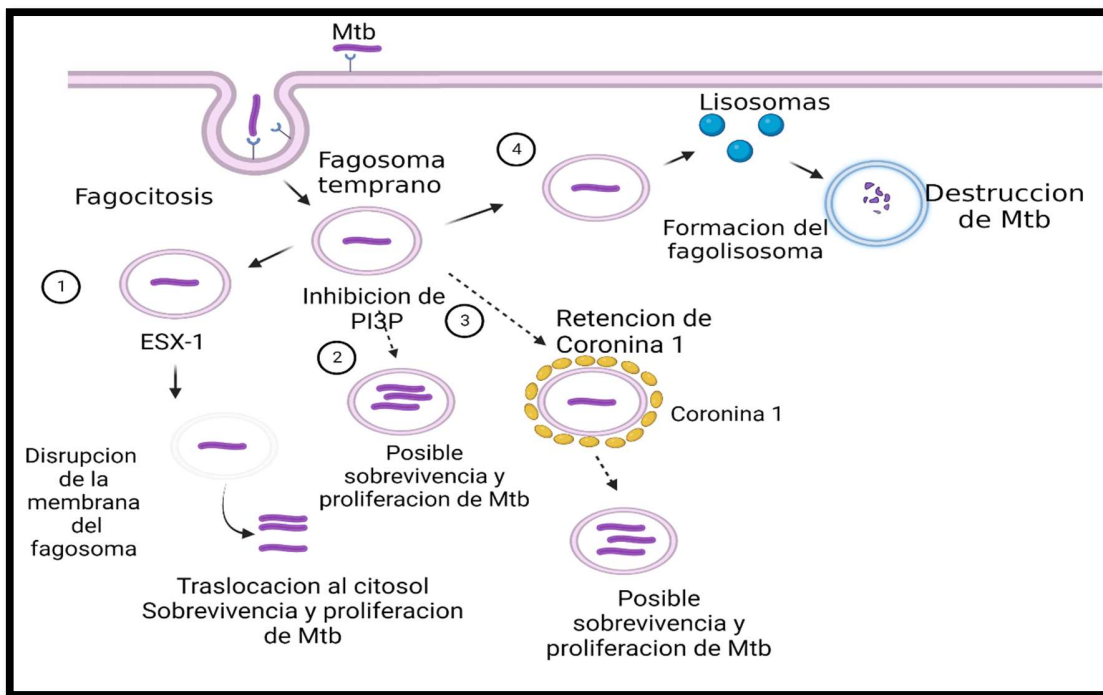
## Infeción del macrófago

La tuberculosis se transmite de persona a persona a través de la inhalación de aerosoles contaminados. Una vez inhaladas, las bacterias alcanzan la zona alveolar de los pulmones y es ahí en donde son detectados por los macrófagos que residen en esta zona del pulmón a los que se les denomina macrófagos alveolares (Gengenbacher and Kaufmann, 2012)

Dado que el proceso de respiración conlleva a la inhalación de partículas extrañas, los macrófagos alveolares están en constante contacto con estas partículas, dando como resultado que estos macrófagos se encuentren en un estado de preactivación. Por esta razón los macrófagos alveolares suelen ser eficientes para reconocer patógenos, en este caso el bacilo *M. tuberculosis*. Sin embargo, si el bacilo se enfrenta con un macrófago pobremente 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 la posterior liberación de más bacterias, para poder continuar con la infección. La liberación del bacilo, desechos celulares, y otros factores quimio-atrayentes producidos por el macrófago, inducen el reclutamiento de células dendríticas y monocitos. Estos últimos se diferenciarán a macrófagos en los alveolos, por lo que la bacteria se aprovecha de su estado inactivo para infectarlos y así crear un estado en donde, ambos interactúan pero no se destruyen (Dannenberg and Rook, 1994)

Aunque los macrófagos son células especializadas en fagocitar y destruir patógenos *M. tuberculosis* ha desarrollado varias estrategias para inhibir la fusión de fagosoma con el lisosoma y sobrevivir dentro del macrófago como son : Inhibir la maduración del fagosoma temprano, esto lo logra a través de secretar la proteína ESAT-6 la cual inhibe a Rab 7 impidiendo la maduración del fagosoma, también se ha descrito que ESAT-6 disrumpe la membrana del fagosoma temprano, ocasionando que *M. tuberculosis* sea liberado al medio. De igual forma se ha descrito que *M. tuberculosis* inhibe la maduración del fagosoma a través de evitar la fosforilación y disminuir la biogénesis de fosfatidilinositol, provocando que la bacteria prolifere y siga viva dentro del fagosoma (Esquema 2 ) (Armstrong and Hart, 1971; Liu and Modlin, 2008; Soldati and Neyrolles, 2012). Por otro lado se ha descrito de un mecanismo que involucra a la proteína coronina 1, que se recluta inmediatamente a los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* (BoseDasgupta and Pieters, 2014). Además, *M. tuberculosis* induce que el macrófago secrete citocinas antiinflamatorias, activando así al

sistema inmune adaptativo. Aunado a esto, Fulton y col. (2004) observaron que tras la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos alveolares redujeron considerablemente la expresión del Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo II (MHC-II) en la membrana, inhibiendo así la activación de células T, y ocasionando que la célula infectada no sea destruida. De esta forma la bacteria promueve su supervivencia



Esquema 2.- *M. tuberculosis* inhibe la fagocitosis y promueve su supervivencia. *M. tuberculosis* puede inhibir la maduración del fagosoma temprano (1) *M. tuberculosis* secreta ESAT-6, la cual desestabiliza y quebranta la membrana del fagosoma, esto ocasiona que *M. tuberculosis* sea liberada al citoplasma donde puede sobrevivir y multiplicarse. (2) *M. tuberculosis* puede bloquear la maduración del fagosoma al inhibir la producción de Fosfatidilinositol 3- fosfato (PI3P), lo que provoca que *M. tuberculosis* prolifere y se mantenga viva dentro del fagosoma (3) *M. tuberculosis* secuestra a coronina 1, impidiendo la fusión del fagosoma con los lisosomas, de esta forma *M. tuberculosis* puede sobrevivir dentro del fagosoma. (4) Los fagosomas maduran de manera correcta y se fusionan con los lisosomas. Una vez dentro del fagolisosoma *M. tuberculosis* es destruido de manera eficiente en la mayoría de los casos (Imagen tomada y modificada de (Tábāran et al., 2020).

## El granuloma y la producción de Citocinas inflamatorias

Los macrófagos infectados llegan al epitelio pulmonar, donde inician una respuesta inflamatoria mediante la producción de citocinas, como TNF (tumor necrosis factor por sus siglas en inglés) y la Interleucina 6 (IL-6). IL-6 es una proteína multifuncional, con actividad tanto inflamatoria como antiinflamatoria, que promueve la proliferación de linfocitos (Jaques, 1990; Scheller et al., 2011). De acuerdo con esto, la IL-6 tienen una función protectora contra *M. tuberculosis*, ya que ratones deficientes de IL-6 son más susceptibles a la infección causada por *M. tuberculosis* (Ladel et al., 1997). El TNF es una citocina que también juega un papel importante en el control de la infección. Por ejemplo, los ratones deficientes para TNF son muy susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* (Sasindran and Torrelles, 2011). El TNF conlleva a la activación de macrófagos y al 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) que se generan cuando el sistema inmune intenta aislar organismos extraños que no pudo eliminar de manera eficaz debido a los mecanismos de evasión que posee. 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, la enfermedad ser asintomática y la infección no contagiosa (Gengenbacher and Kaufmann, 2012). Sin embargo, esta estructura se puede ver comprometida por una mala nutrición, envejecimiento o inmuno deficiencia. En estos casos, el granuloma pasa a una fase de decaimiento y se debilita, lo que provoca que la bacteria se reactive y se libere, volviendo así a su forma infecciosa (Aung et al., 2002).

Por otro parte el Interferón gamma (IFN $\gamma$  por sus siglas en inglés) es una citocina producida principalmente por los linfocitos T y las células *natural killer* (NK). La función más importante del IFN $\gamma$  es la activación de los macrófagos, por lo que juega un papel fundamental en el control de *M. tuberculosis*. Se sabe que individuos con defectos en la producción de IFN $\gamma$  presentan problemas para controlar la infección causada por *M. tuberculosis* (Rosenzweig and Holland, 2005). No obstante, la acción de IFN $\gamma$  no es suficiente para controlar la enfermedad. Se ha reportado que individuos con niveles normales de IFN $\gamma$  son también susceptibles a *M. tuberculosis*, aunque en menor grado que los

deficientes, lo cual se ha atribuido a que *M. tuberculosis* promueve la producción de citocinas antiinflamatorias, como 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 *M. tuberculosis*. De hecho, al suministrar IFN $\gamma$ , anticuerpos anti-IL-10, o la forma soluble del receptor de 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).

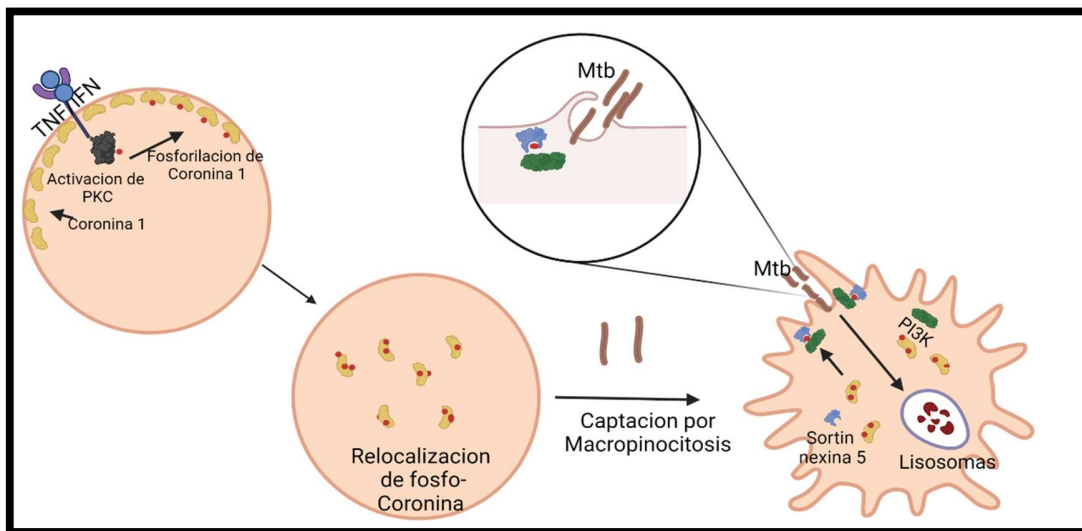
IL-12 es una proteína inflamatoria que consta de dos subunidades, p40 y p35. Esta citocina es producida principalmente por macrófagos y células fagocíticas, sus principales funciones son: promover la producción de IFN $\gamma$  y activar e inducir la proliferación de linfocitos T. Esta citocina juega un papel crítico en la regulación de la infección por tuberculosis, ya que se ha observado que los ratones deficientes de IL-12 son más susceptibles a la infección causada por *M. tuberculosis*.

## **Macropinocitosis**

La macropinocitosis es un proceso de endocitosis inducible y transitorio asociado con la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática (ruffling) que conduce a la internalización de fluidos o partículas en vesículas denominadas macropinosomas. También le permite internalizar mayor cantidad de partículas o partículas de mayor tamaño (Swanson, 2008; Yoshida et al., 2015). A diferencia de otros tipos de endocitosis, la macropinocitosis no está necesariamente regulada por la unión selectiva entre ligando-receptor y el reclutamiento de moléculas efectoras a sitios específicos de la membrana plasmática para formar vesículas recubiertas por donde internaliza el ligando (Kerr and Teasdale, 2009). En algunas células, la macropinocitosis puede ser inducida por factores de crecimiento o por algunos patógenos como *Salmonella*, *Shigella* o algunos virus (Swanson, 2008)

Pieters y col. (2014) demostraron que los macrófagos pueden cambiar la forma de internalizar bacterias, de fagocitosis a macropinocitosis, con un estímulo inflamatorio como el provocado por TNF e IFN $\gamma$ , permitiendo la rápida internalización de bacterias y otros patógenos hacia los lisosomas sin la necesidad de ser regulada o mediada por receptores específicos. Ese cambio representa varias ventajas para la destrucción de patógenos como el *Mycobacterium*

*tuberculosis*, porque, como se mencionó anteriormente, promueve su supervivencia al inhibir la formación de la fagolisosoma a través del secuestro de coronina 1. La retención de coronina 1 en el fagosoma activa a la calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio responsable de bloquear la formación del complejo fago-lisosoma (o “la fusión del fagosoma al lisosoma”) lo que contribuye a la supervivencia de *M. tuberculosis* (BoseDasgupta and Pieters, 2014; Pieters, 2008). La coronina 1 fosforilada también induce un cambio en el proceso de endocitosis, pasando de la fagocitosis a la macropinocitosis (BoseDasgupta and Pieters, 2014; Jayachandran et al., 2007) (esquema 3). De manera interesante, se ha demostrado que la macropinocitosis es un mecanismo eficaz para destruir a *M. tuberculosis*. Dado que no está limitada por receptores, por macropinocitosis se internaliza una gran cantidad de bacterias y la carga se entrega directamente a los lisosomas (Swanson, 2008; Swanson and King, 2019). Aunque los mecanismos desplegados por *M. tuberculosis* para secuestrar la maquinaria de macrófagos y bloquear la endocitosis han sido ampliamente discutidos, la forma en que *M. tuberculosis* altera la transcripción para evitar la expresión de genes que codifican citocinas implicadas en la activación de macrófagos, como TNF e IFN $\gamma$ , no se encuentra del todo elucidada.



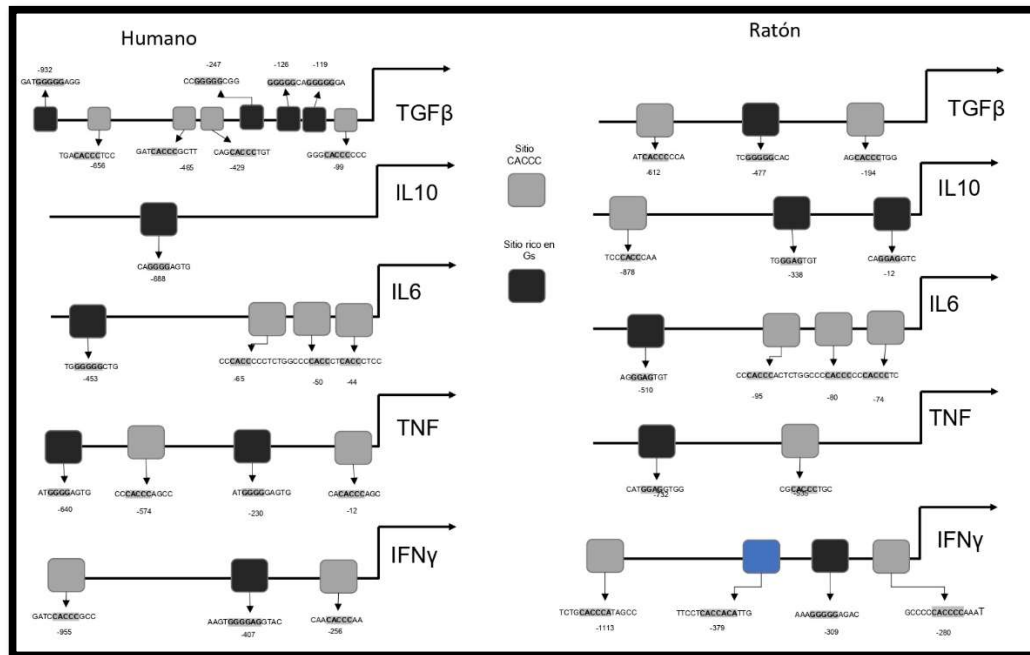
Esquema 3.- **Macrófagos destruyen a *M. tuberculosis* por macropinocitosis.** Un estímulo inflamatorio (como TNF o IFN $\gamma$ ), activa a los macrófagos a través de PKC. Lo que induce la fosforilación de coronina 1, provocando que esta proteína se relocalice de la corteza celular al citoplasma. Esto ocasiona que coronina 1 interactúe y active a sortin nexina 5, lo que desencadenará la fosforilación y activación de PI3K. Dando como resultado el cambio de fagocitosis a macropinocitosis. Una vez que un macrófago cambia a macropinocitosis estos son más eficientes para endocitar y destruir a *M. tuberculosis*.



## **KLF10 o TIEG**

Klf10 es un factor de transcripción que pertenece a la familia KLF, que se identificó inicialmente en osteoblastos humanos como un gen de respuesta temprana a TGF $\beta$ . Por lo tanto, también se conoce como el gen temprano inducible de TGF $\beta$  (TIEG1) (Subramaniam et al., 1995). Klf10 actúa como un activador o represor que controla la expresión génica en procesos celulares críticos como la apoptosis, la proliferación, la diferenciación, el desarrollo neuronal y la inflamación (Cao et al., 2009a; Iyer and Cheng, 2012; Martínez-Armenta et al., 2015). Los macrófagos de colon de ratones deficientes en Klf10, con colitis inducida experimentalmente produjeron más TNF e IL-6 y menos IL-10 en respuesta a los lipopolisacáridos (LPS) que los macrófagos de ratones silvestres (Papadakis et al., 2015a). Asimismo, la inactivación de Klf10 en un modelo de ratón con asma aumenta la migración de neutrófilos a los pulmones en condiciones basales y en respuesta a la albúmina sérica bovina, así como la expresión del ARNm de *TNF* en el pulmón de ratones silvestres (Huang et al., 2016). Estos datos en conjunto demuestran que la ausencia de Klf10 promueve un ambiente inflamatorio, ya que se observa un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF e IFN $\gamma$ , así como una disminución en la producción de IL-10.

De manera interesante, al hacer un análisis bio informático de los promotores de *IL-6*, *TNF*, *IL-10*, *TGF $\beta$*  e *IFN $\gamma$*  de humano y ratón encontramos que estos tienen en su secuencia, sitios de unión de KLF10 (esquema 4). Esto sugiere que Klf10 puede regular negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias a inducir la expresión de los genes que codifican citocinas antiinflamatorias. Dado que las citocinas inflamatorias como TNF e IFN $\gamma$  se requieren para que el macrófago mejore su capacidad destructiva contra *M. tuberculosis* y que este patógeno induce la expresión de los genes que codifican las citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF $\beta$  para evitar su destrucción, es posible que *M. tuberculosis*, a través KLF10 ejerza este efecto regulatorio promoviendo así un ambiente antiinflamatorio que le permite sobrevivir dentro del macrófago e iniciar un proceso infeccioso exitoso.



Esquema 4.- Sitios de unión putativos de Klf10 de *Mus musculus* y *Homo Sapiens*. Esquema donde se muestran los promotores de las citocinas: TGF $\beta$ , IL10, IL6, TNF e IFN $\gamma$ , en estos promotores encontramos sitios de unión putativos del factor transcripcional KLF10. En los cuadros grises se muestra en las cajas CACCC, en negro los sitios ricos Gs y Cs y en azul, el sitio de unión predicho por la plataforma Genomatix.

## Justificación

La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial, incrementando los casos anualmente y afectando principalmente a países en vías de desarrollo. A pesar de que existen vacunas y tratamientos de primer y segunda línea en contra de la *M. tuberculosis*, aun no se ha podido erradicar la enfermedad; por el contrario, cada año se ha observado el surgimiento de cepas que son resistentes a los tratamientos de primer y segunda línea. Esto hace necesario la generación de medicamentos y terapias alternativas en contra del bacilo. Por la cual, elucidar los mecanismos moleculares que tiene *M. tuberculosis* para promover su sobrevivencia dentro del huésped y que estrategias tiene el huésped para poder controlar a la bacteria son necesarios. La evidencia previamente mostrada, sugiere que Klf10 a través de su capacidad dual de inductor y represor de la expresión génica, puede modular la

inflamación lo cual juega un papel crucial para el control, desarrollo o progreso de la tuberculosis.

## **Hipótesis**

*M. tuberculosis* promueve su sobrevivencia dentro de los macrófagos al inducir o activar al factor transcripcional Klf10, para atenuar la respuesta inflamatoria y de esta forma garantizar una infección exitosa.

## **Objetivo general**

Evaluar la función de Klf10 en la regulación de la respuesta inflamatoria durante la infección del macrófago por *M. tuberculosis*.

## **Objetivos Particulares**

Evaluar si Klf10 regula la producción de citocinas proinflamatorias de macrófagos en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*.

Determinar si *M. tuberculosis* promueve su sobrevivencia al inhibir la macropinocitosis.

Evaluar la función de Klf10 en un modelo murino de tuberculosis.

## **Materiales y métodos**

### **Anticuerpos**

El anticuerpo anti-IFN $\gamma$  (#513205), el bloqueador FC TruStain FcX™ (anti-ratón CD16/32 # 101320), el anti CD11b Alexa Flour 488 (#101217), EL anti-Ly6c/GR1 Alexa Flour 700

(#108418) se adquirieron de BioLegend. El anticuerpo anti- $\beta$ -actina (#3700) se adquirió de Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti-coronina-1A (sc-100925) se adquirió de Santa Cruz Biotechnology. El anti cuerpo anti ratón acoplado a Alexa Flour (#A21236) se adquirió de Invitrogen y la faloidina acoplada a Alexa Flour 488(AB\_2315147) se adquirió de life technologies.

## **Reactivos**

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato) se adquirió en Thermo Fisher Scientific. La colchicina y el PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato) se adquirieron de Sigma-Aldrich. Phos-tag<sup>TM</sup> se adquirió en FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. El inhibidor de PKC Go6983 se adquirió de Calbiochem. El LPS y el Triton X-100 se adquirieron de Sigma-Aldrich. El agar Bacto Middlebrook y el OADC se compraron en Difco Laboratories.

## **Animales**

Los ratones  $Klf10^{-/-}$  en el fondo C57BL/6NJ fueron amablemente donados por el Dr. Subramaniam de la Clínica Mayo Rochester Minnesota (Subramaniam et al., 2005). Los ratones C57BL/6NJ silvestres y  $Klf10^{-/-}$  se mantuvieron en estantes ventilados con comida y agua *ad libitum*. Todas las pruebas se realizaron durante el ciclo de luz utilizando ratones macho de 8 a 10 semanas de edad. El genotipo del animal se corroboró por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el comité de Bioética del instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto 384) y por el comité de bioética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Proyecto PAT-1973-19/20-1)

## **Líneas celulares**

Las células L929 se cultivaron en medio DMEM (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (SFB), penicilina/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml). (GIBCO-Invitrogen) y glutamina

2 mM (Sigma-Aldrich). Para generar el medio acondicionado L929, se sembraron  $5 \times 10^5$  células en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> con 30 ml de medio suplementado durante 7 días. El medio de cultivo (sobrenadante) se centrifugó a 213g durante 7 min y se filtró con un filtro de 0,22  $\mu$ m. Finalmente, los medios condicionados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La línea mixta de células MH-S (ATCC), derivada de la transformación SV40 de una población de macrófagos alveolares de ratón BALB/, se cultivó en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml) (GIBCO).

### **Macrófagos derivados de médula ósea (MDM)**

Se obtuvieron fémures de ratones C57BL/6 silvestres o Klf10<sup>-/-</sup>, de 8 a 10 semanas de edad. Después de la disección, los músculos se removieron del hueso y los fémures se colocaron en un tubo de polipropileno que contenía PBS estéril; luego se colocaron en etanol al 70% por 1 min, se lavaron en PBS estéril y se retiraron ambas epífisis. Los huesos se enjuagaron con PBS usando una jeringa para extraer la médula ósea en un tubo de polipropileno de 15 ml; A continuación, las células de médula ósea se centrifugaron a 200 g durante 5 min a temperatura ambiente, se lavaron y se resuspendieron en medio de diferenciación de médula ósea (DMEM suplementado que contenía medio condicionado L929 al 20 % como fuente de factor de crecimiento de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos). Se sembraron  $5 \times 10^6$  células en placas de Petri de plástico de baja adherencia de 100 mm.

Las células se incubaron a 37 °C en aire humidificado con 5 % de CO<sub>2</sub>. Cuarenta y ocho horas después de la siembra, se descartaron 5 ml del medio y se reemplazaron con 5 ml de medio condicionado fresco, este paso se repitió cada 48 h. Al 7º día se descartó el medio, se lavaron las células con 10 ml de PBS y se incubaron en 2 ml de solución fría de Versene a temperatura ambiente durante 5 min. Las células se separaron pipeteando suavemente, se centrifugaron a

200 g durante 5 min y se resuspendieron en medio RPMI suplementado. Los macrófagos se contaron y cultivaron en placas 12 h antes del procedimiento experimental.

## **Citometría de Flujo**

Para evaluar la expresión del marcador de la superficie celular, se incubaron  $1 \times 10^6$  MDM con el anticuerpo bloqueador FC TruStain FcX™ (1 µg) durante 15 min en hielo. Luego, las células se tiñeron conjuntamente con anti-CD11b (1:2000) y anti-Ly6c/GR1 (1:1000), se lavaron con jugo FACS (PBS 1% y SFB 5%) y se fijaron con formadehído fresco preparado a partir de paraformaldehído (PFA) al 2%. Para determinar las señales no específicas, se usaron controles de isotipo a la misma concentración que los anticuerpos específicos. El análisis se realizó utilizando un citómetro de flujo FACSCanto (BD Bioscience) y el software FLOWJO.

## **Cultivos bacterianos**

*Escherichia coli* se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) durante 16 h a 37°C en agitación. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se determinaron sembrando diluciones seriadas en agar LB con antibiótico durante 16 h a 37 °C.

Las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (virulenta) y H37Ra (no virulenta) se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). Después del cultivo, las micobacterias se recogieron y se ajustaron a  $2.5 \times 10^5$  células en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato para experimentos *in vivo*. Para los experimentos *in vitro*, los cultivos bacterianos se dividieron en alícuotas y se mantuvieron a -70° hasta su uso.

Todos los procedimientos para la generación y uso de micobacterias se realizaron en una cabina de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones BSL3 del laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Las cepas de Salmonella entérica *S. Typhimurium* utilizadas en este estudio fueron ST4/74 y SL1344. Las bacterias se cultivaron durante 18 h a 37 °C sin agitación en medio LB (triptona al 1 %, NaCl al 1 % y extracto de levadura al 0,5 %). El inóculo provino de una colonia tomada de una placa de agar con estreptomomicina.

### **Ensayos de fagocitosis y destrucción.**

Se cultivaron MDM ( $2 \times 10^5$ /pozo) en DMEM suplementado, 16 horas más tarde se infectaron con *E. coli* la cual expresa una proteína roja fluorescente (Torres Tejerizo et al., 2015). Los macrófagos se infectaron durante 30 min a 37 °C con una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Posteriormente, las células se lavaron con PBS que contenía penicilina/estreptomomicina (100 µg/ml) y se fijaron con PFA al 4%. A continuación, el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina conjugada con Alexa Fluor 488 en PBS-tritón al 0,1 % a una dilución de 1:500. Para la tinción nuclear se utilizó DAPI en PBS-tritón al 0,01% a una dilución de 1:5000. Finalmente, los macrófagos se observaron con un microscopio confocal Olympus IX81 y se contaron tomando 10 campos aleatorios por muestra.

Para los ensayos de destrucción, se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  MDM en DMEM suplementado y se infectaron 16 h más tarde con *E. coli* utilizando una MOI de 10:1 durante 1 hora para evaluar la capacidad fagocítica, o durante 3,5 horas para evaluar la capacidad destructiva de los macrófagos. Después de los tiempos indicados, los macrófagos se lavaron con PBS que contenía penicilina/estreptomomicina (100 µg/ml); luego se añadió PBS con tritón al 0,01 % a las células y se colocaron en hielo durante 15 min para permitir la lisis de los macrófagos. Posteriormente, se tomaron 100 µl del sobrenadante para preparar diluciones seriadas, luego se sembraron 10 µl de la dilución en LB que contenía espectinomicina (50 µg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se contaron las UFC.

Para el ensayo de destrucción de *S. Typhimurium*, se sembraron  $2 \times 10^5$  MDM y se infectaron con *S. Typhimurium* (MOI 10:1) durante 20 min. Las bacterias no internalizadas se eliminaron lavando tres veces con PBS y luego agregando medio fresco que contenía 100 µg/ml de gentamicina. Para evaluar la invasión, las células se cultivaron adicionalmente durante 2 h y para evaluar la replicación, las células se cultivaron durante 16 h en DMEM

con 25 µg/ml de gentamicina. A continuación, las células se lavaron y lisaron durante 5 min con SDS al 0,1 %/ Tritón X-100 al 1 %/PBS (pH 7,4). Las UFC de bacterias intracelulares se determinaron sembrando 10 µl de diluciones seriadas en agar LB sin antibióticos.

Para evaluar la fagocitosis y destrucción de *M. tuberculosis*, se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  MDM y posteriormente se infectaron con *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) o H37Rv (MOI 5:1) durante 1 h o 24 h, respectivamente. A continuación, las células se lavaron con PBS que contenía penicilina/estreptomicina (100 µg/ml y se lisaron en 100 µl de SDS al 0,1 % y 100 µl de BSA al 20 %. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas y 10 µl de cada dilución se sembraron en medio Middlebrook 7H10, se incubaron en la oscuridad durante 21 días a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, luego se contaron las UFC.

### **Cálculo de la capacidad bactericida**

La capacidad destructiva se calculó dividiendo el número de bacterias fagocitadas entre el número de bacterias vivas al final de la infección. Después se promedió la capacidad destructiva de los ratones silvestres y se normalizo a 1. La capacidad bactericida se calculó dividiendo la capacidad destructiva de los macrófagos silvestres y macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> por el promedio normalizado con y sin infección.

### **Intercambio de sobrenadantes**

Se cultivaron MDM de tipo silvestre o deficientes en *Klf10* ( $1.5 \times 10^5$ ) durante 24 h, posteriormente se tomaron los sobrenadantes y se descartaron las células. Luego, el sobrenadante de MDM *Klf10*<sup>-/-</sup> se usó para cultivar MDM silvestres y el sobrenadante de MDM silvestres se usó para cultivar MDM *Klf10*<sup>-/-</sup>; 24 horas más tarde, las células se infectaron con *E. coli* (MOI 10:1) durante 1 h o *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) durante 1 h. Los ensayos de fagocitosis y destrucción se realizaron como se describe anteriormente.



## **Bloqueo de interferón**

Los MDM silvestres o deficientes en Klf10 ( $1.5 \times 10^5$ ) se trataron con anti-IFN $\gamma$  (500 ng/ml) 16 h antes de la infección. Los MDM se lavaron con PBS y se añadió medio fresco. Posteriormente, los MDM se infectaron con *E. coli* (MOI 10:1) o *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) durante 1 h. Los ensayos de fagocitosis y destrucción se realizaron como se describe anteriormente.

## **Inhibición de la macropinocitosis**

Los MDM silvestres o deficientes en Klf10 ( $1.5 \times 10^5$ ) se trataron con colchicina (100  $\mu$ g/ml) durante 30 min; luego se lavó con PBS. Se añadió medio fresco y los MDM se infectaron con *E. coli* (MOI 10:1) o *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) durante 30 min. Los ensayos de macropinocitosis, fagocitosis y destrucción se realizaron como se describe anteriormente.

## **ELISA**

Para la cuantificación de TNF e IFN $\gamma$ , los MDM  $4 \times 10^5$  se dejaron sin estímulo o se trataron con LPS (100 ng/ml), a *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) o a *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) durante 1 h. Posteriormente, los MDM se lavaron con PBS que contenía penicilina/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml). Después de añadir medio fresco, las células se cultivaron durante otras 24 h. Se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de TNF e IFN $\gamma$  usando kits ELISA de BioLegend (Max Deluxe #430804).

## **Microscopia electrónica de transmisión**

Los MDM ( $2.5 \times 10^6$ ) sin estímulos o infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) se fijaron con glutaraldehído al 15 % en los puntos de tiempo indicados. La postfijación se realizó con tetróxido de osmio al 1%. Las muestras se deshidrataron en alcoholes etílicos graduados y se incluyeron en resina de baja viscosidad. Se prepararon secciones de 1  $\mu$ m, luego se obtuvieron secciones ultrafinas de 90nm con un ultramicrotomo Sorval MT-6000,

se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo como se describió previamente en (Bongiovanni et al., 2015) y se examinaron con un Microscopio Electrónico de Transmisión FEI Tecnai TWIN.

## **Inmunofluorescencia anti-Coronina 1**

Los MDM ( $5 \times 10^4$ ) se sembraron en Lab-Tek® Chamber Slide™ (Merk). Cuatro horas después, se eliminó el medio y se añadió medio fresco, luego se trataron los MDM con PMA (50 ng/ml) durante 4 horas o con el anticuerpo anti-IFN $\gamma$  (500 ng/ml) durante 16 h. Luego se eliminó el medio y los MDM se lavaron extensamente con PBS y se fijaron en PFA al 4 % (Sigma-Aldrich Inc) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con PBS que contenía Triton TX-100 al 0,1 % durante 30 min a temperatura ambiente. La actina se visualizó incubando las células durante 1 hora con faloidina conjugada con Alexa Fluor 488 (1:500). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (1:5000) durante 15 min. La Coronina 1 se visualizó incubando con anti-coronina 1A (1:200) durante 4 h y con un anticuerpo de ratón secundario Alexa Fluor A647 (1:400) durante 1 h. Se tomaron imágenes de los MDM utilizando el microscopio vertical confocal Olympus FV1000.

## **Obtención de extractos proteicos y Western Blot**

Los MDM se lisaron en 100  $\mu$ l de buffer de lisis (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 137 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 25 mM pH 7,4, PPINa 2 mM, EDTA 2 mM pH 7,4, Triton X-100 al 1 %, glicerol al 10 %), suplementado con inhibidores de proteasas (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Na $_3$ VO $_4$  200 mM, DTT 0,1 mM, PMSF 1 mM) durante 15 min a 4° C. Los lisados se centrifugaron a 19,318 gravedades durante 10 min a 4°C, los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron a -70°C hasta su uso. Para visualizar la fosforilación de la coronina 1 los extractos proteicos se resolvieron en un gel SDS-PAGE, preparado con acrilamida que contiene Phos-tag 50 $\mu$ M y MnCl $_2$  50 $\mu$ M. Posteriormente para la detección de la proteína se utilizaron los anticuerpos anti-coronina-1A y anti- $\beta$ -actina como control de carga. Las

interacciones anticuerpo-antígeno se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando un instrumento LI-COR Biosciences.

## **Infección del ratón**

Se usaron ratones macho C57BL/6NJ silvestres y C57BL/6NJ Klf10<sup>-/-</sup> de 11 o 12 semanas de edad para los experimentos de infección. Los animales fueron anestesiados con vapor de sevoflurano (100 µl por ratón) para la infección intratraqueal como se describió previamente (Hernández-Pando et al., 2006). Brevemente, los animales se colocaron en una placa unicel recubierta de aluminio y los incisivos se sujetaron con una banda de goma, se insertó una cánula de punta roma de 22G x 1,0 de 1,25 mm a través de la tráquea y se infectaron con 250.000 UFC cada uno, con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, suspendida en solución salina (SS). Los animales fueron sacrificados en los puntos de tiempo indicados después de la infección, los pulmones fueron diseccionados y almacenados a -70°C hasta su uso. Los animales infectados con micobacterias fueron alojados y manipulados bajo protocolos de bioseguridad animal de nivel 3.

## **Determinación de la carga bacteriana pulmonar**

Los pulmones se descongelaron y se añadieron 500 µl de PBS-tween al 0,05%. El tejido se homogenizó con el sistema FastPrep y la mezcla se llevó a un volumen final de 1 ml con PBS-Tween al 0.05%. Se esparcieron cuatro diluciones de cada homogenizado en placas duplicadas que contenían agar Bacto Middlebrook enriquecido con OADC. Las colonias bacterianas se contaron 21 días después.

## **Pacientes y procesamiento de muestras**

En este estudio se incluyeron muestras de cinco pacientes mayores de 18 años con tuberculosis pulmonar activa. Estas muestras fueron tomadas en el 2018 en el Instituto

Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México (código de protocolo B07-18), y cinco muestras de donantes sanos. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para utilizar sus muestras de sangre y datos clínicos para la investigación. Los pacientes fueron diagnosticados con tuberculosis sensible a los medicamentos tuberculosos de primera línea en el momento del diagnóstico, se excluyeron los pacientes con infección por VIH, enfermedades crónicas, insuficiencia renal crónica y cirrosis hepática.

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó con 6 ml de sangre total recolectada en tubos BD Vacutainer® y EDTA mediante centrifugación en gradiente de densidad estándar Lymphoprep™ (Accurate Chemical-Scientific, Westbury, NY, EE. UU.). Luego, se suspendieron  $2 \times 10^6$  PBMC en solución DNA/RNA Shield (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) en una proporción de 1 a 3 volúmenes de muestra a la solución, se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente para permitir la lisis celular, preservando la estabilidad del ARN. Los lisados celulares se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta que se usaron para la extracción de ARN.

## **Extracción de ARN y qPCR**

El ARN total se aisló de  $2.5 \times 10^5$  de la línea MH-S de macrófagos alveolares de ratón los cuales fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) o *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) durante 2 h, usando el método de extracción con tiocianato de guanidina como se describió previamente (Pérez-Martínez et al., 1998).

La transcripción inversa se realizó utilizando 1  $\mu\text{g}$  de ARN de macrófagos de ratón MH-S o 200 ng de ARN de células mononucleares periféricas de pacientes, oligo dT y transcriptasa inversa M-MLV (28025013, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La PCR en tiempo real se realizó con TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (4444963, Applied Biosystems) o Luminaris Probe High Rox qPCR Master Mix (K0933, Thermo Fisher Scientific) con los siguientes ensayos de expresión génica Taqman® (Applied

Biosystems): Klf10 ( Mm00449812\_m1, Hs00921811\_m1), IFN $\gamma$  (Hs00989291\_m1), Ndufa10 (Ubc, Mm01240336\_1) y Gapdh (Hs02758991\_g1). Los niveles de transcripción se determinaron utilizando un sistema de detección de secuencias Step One (Applied Biosystems). Los niveles de expresión relativos se calcularon mediante la normalización frente a Ubc o Gapdh usando el método  $\Delta\Delta CT$  (Livak and Schmittgen, 2001).

### **Análisis estadístico**

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 o dos vías y pruebas t. Posteriormente se realizó prueba de Tukey para evaluar la significancia estadística realizando múltiples comparaciones, para esto se utilizó el software estadístico GraphPad Prism 8. El valor de significancia se definió como \*P<0.05, \*\*<P 0.01, \*\*\*P< 0.001 y \*\*\*\*P< 0.0001.

## Resultados

### Los macrófagos carentes de *Klf10* presentan una mayor activación en respuesta a estímulos inflamatorios.

Dado que se evaluó el papel de *Klf10* en el proceso de infección por *M. tuberculosis* en macrófagos diferenciados a partir de médula ósea, determinamos si la falta de *Klf10* afecta la diferenciación de macrófagos *in vitro*. Para esto, se aislaron células de médula ósea de ratones silvestres (Wt) y *Klf10*<sup>-/-</sup> y las diferenciamos a macrófagos (MDM). Por citometría de flujo se observó que la ausencia de *Klf10* no afectó la diferenciación de las células de la médula ósea a macrófagos, ya que el 80% de las células diferenciadas expresaban el antígeno CD11b, el cual es un marcador que se expresa preferencialmente en las membranas de los macrófagos, y no hubo diferencias estadísticas con respecto a la proporción obtenida de médula ósea de animales Wt (Fig. 1A, 1B y 1C). Asimismo, encontramos que el porcentaje de macrófagos no estimulados CD11b<sup>+</sup> que expresaron Ly6c (Ly6c<sup>+</sup>) fue similar entre los provenientes de animales Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> (Fig. 1D y 1E). Tampoco observamos diferencias significativas en el número de moléculas CD11b (Fig. 1C) y Ly6c (Fig. 1F) en la superficie celular de los macrófagos silvestres y aquellos provenientes de ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> no estimulados ya que los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) fueron semejantes. Estos datos indican que la ausencia de *Klf10* no afecta el proceso de diferenciación de los macrófagos. De acuerdo con datos publicados previamente, donde muestra que los macrófagos de colon obtenidos de ratones deficientes en *Klf10* presentan un fenotipo activado (Papadakis et al., 2015b), se encontró que al estimular con LPS o infectar con *M. tuberculosis* H37Ra, la población de macrófagos carentes de *Klf10* (macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup>) que expresa el marcador de activación Ly6c casi se duplicó (Fig. 1E). De manera congruente, encontramos que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> Ly6c<sup>+</sup> expresaron aproximadamente un 20 % más de Ly6c en la superficie celular en respuesta a *M. tuberculosis* H37Ra o LPS en comparación con los macrófagos silvestres, según lo determinado por la intensidad media de fluorescencia (Fig. 1F). Estos resultados muestran que, en respuesta a estímulos como *M. tuberculosis* o LPS, los macrófagos de los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> se activan más que los macrófagos silvestres.

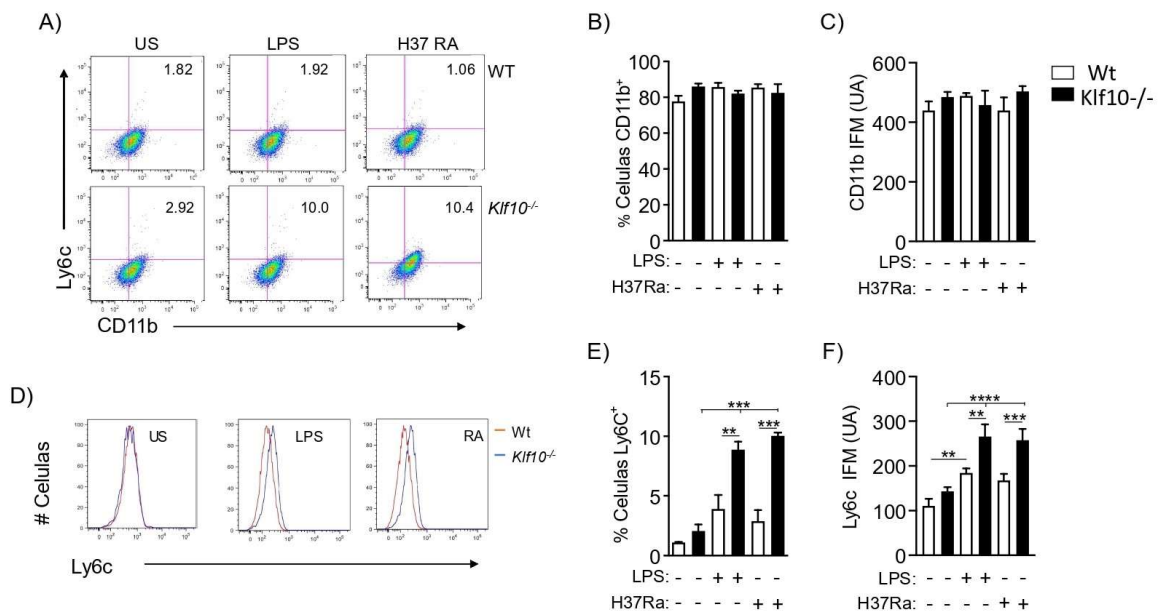


Figura 1.-Caracterización de macrófagos derivados de médula ósea de ratones silvestres y *Klf10*<sup>-/-</sup>. 4X10<sup>5</sup> células fueron infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra (MOI. 10:1) o estimuladas con LPS (100 ng / ml) durante 1 hora. Posteriormente se co-tiñeron con los anticuerpos Ly6c y CD11b durante 30 minutos y se analizaron por citometría de flujo (A). El gráfico muestra el porcentaje de células positivas para CD11b (B). Gráfica de IFM de CD11b (C) La IFM de la expresión de Ly6c se midió con o sin estímulo (US), tratadas con LPS o infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra. (D). El gráfico muestra a las células que dieron positivo para Ly6c (E). Gráfica de IFM de Ly6c (F). Los datos representan la media ± sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 se determinaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. AU, unidades arbitrarias.

## La ausencia de Klf10 estimula una mayor capacidad fagocítica y destructiva

Dado que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> muestran una mayor activación al ser estimulados, se decidió averiguar si estos macrófagos eran más eficientes para fagocitar bacterias. Para elucidar esto, macrófagos Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> fueron infectados durante una hora con la cepa de *E. coli* DH5, la cual expresa una proteína roja fluorescente (mCherry). De manera interesante, encontramos que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> fagocitaron 1.5 veces más bacterias en comparación con los macrófagos silvestres (Fig. 2A y 2B) y que la mayoría de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> habían fagocitado (cerca del 90% en comparación con los silvestres de los cuales cerca de un 75% había fagocitado bacterias) (Fig. 2C). Sin embargo, la capacidad fagocítica no está necesariamente relacionada con la capacidad destructiva. Para evaluar qué tan eficientes eran

los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> en la destrucción de bacterias, realizamos ensayos de fagocitosis y destrucción. De acuerdo con los datos presentados anteriormente, una hora después de la infección, el número de bacterias en los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> fue mayor en comparación con los macrófagos Wt, lo que confirmó que estos macrófagos eran más eficientes para fagocitar (Fig. 2D). Aunado a esto, después de 3.5 horas del inicio de la infección, los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> contenían un número significativamente menor de bacterias que los macrófagos silvestres, mostrando así, una mayor capacidad destructiva en comparación con los macrófagos silvestres (Fig. 2E). En conjunto, estos resultados indican que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> tienen una mayor capacidad fagocítica y destructiva que los MDM Wt.

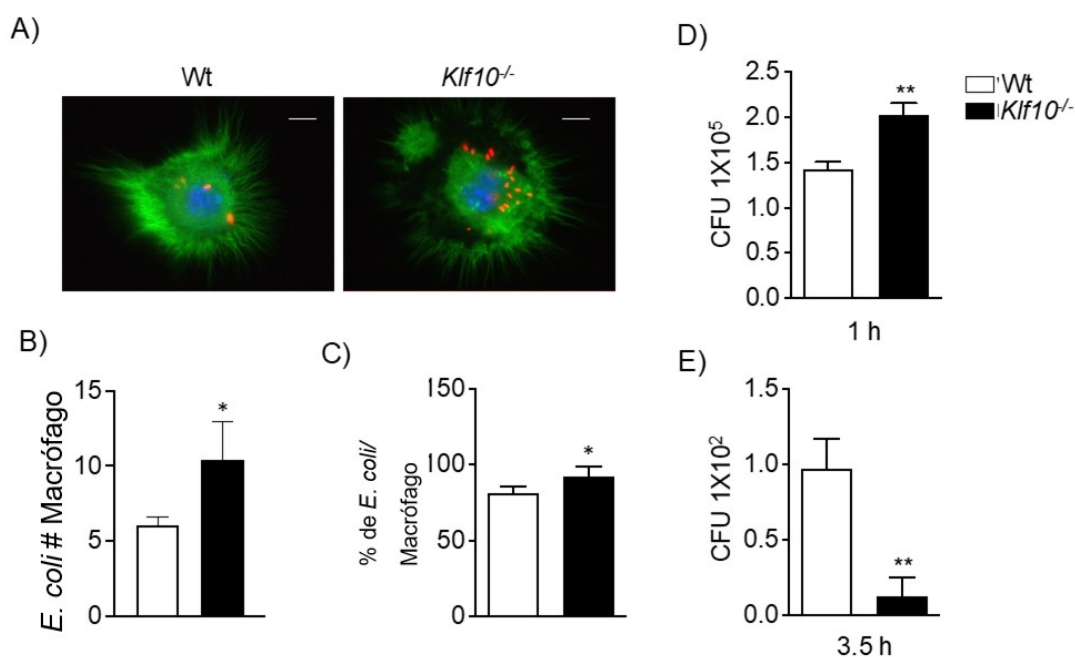


Figura 2.- Los MDM *Klf10*<sup>-/-</sup> muestran una mayor actividad fagocítica y bactericida frente a *E. coli*. Se infectaron  $2.5 \times 10^5$  silvestres (Wt) o deficientes en *Klf10* (*Klf10*<sup>-/-</sup>) (MOI 10:1) con *E. coli* fluorescente, luego se fijaron las células, se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa Fluor 488my se analizaron mediante microscopía confocal (A). La barra de escala representa 3 μm. El grafico representa el número de *E. coli* por macrófago (B) y el número de macrófagos que habían fagocitado (C). El número de *E. coli* fagocitadas después de 1 hora se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos (D). El número de *E. coli* supervivientes después de 3.5 h de infección se determinó mediante el cultivo de bacterias a partir de lisados de macrófagos (E). Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,01, \*\*P<0,001 se determinaron mediante prueba t no pareada.



## **Los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> son más eficientes destruyendo a *M. tuberculosis***

Dado que *M. tuberculosis* es conocido por su capacidad para evadir la respuesta inmune y sobrevivir dentro del macrófago a través de varios mecanismos, se averiguó si los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> podían destruir *M. tuberculosis*. Por lo tanto, infectamos macrófagos Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> con las cepas H37Ra (no patógena) o H37Rv (patógena) durante 1 hora para medir la capacidad fagocítica de los macrófagos y 24 horas después de la infección para evaluar su actividad bactericida. Aunque no hubo diferencias significativas entre la capacidad fagocítica de los macrófagos Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> frente a la cepa no virulenta *M. tuberculosis* H37Ra (Fig. 3A), los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> fueron más eficientes fagocitando la cepa virulenta H37Rv (Fig. 3D).

Por otro lado, 24 horas después de la infección, encontramos que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> destruyeron *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv de manera más eficiente que los macrófagos Wt (Fig. 3B y 3E). Además, considerando la cantidad de bacterias fagocitadas y las bacterias vivas restantes, los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> fueron al menos cuatro veces más eficientes en la eliminación de las bacterias H37Rv que los macrófagos Wt (Fig. 3C y 3F). Juntos, estos resultados indican que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> muestran capacidades fagocíticas y destructivas aumentadas en contra de bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas como *E. coli* y *M. tuberculosis*, respectivamente.

## **La capacidad fagocítica y destructiva de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> es inducida por IFN $\gamma$**

Debido a que se observó que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> eran más efectivos para fagocitar y destruir bacterias, evaluamos si este fenómeno dependía de un factor soluble liberado en los medios de cultivo que ejerciera sus efectos de forma autocrina o paracrina. Como primer enfoque, cultivamos macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> en medios condicionados con medio de cultivo proveniente de macrófagos Wt por 24 h. y viceversa; luego, realizamos ensayos de fagocitosis y destrucción contra *E. coli* o *M. tuberculosis*. El cultivo de macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup>

en el medio condicionados de macrófagos Wt redujo significativamente su actividad fagocítica (Fig. 4A) y capacidad bactericida contra *E. coli* (Fig. 4B y 4C). Esas actividades

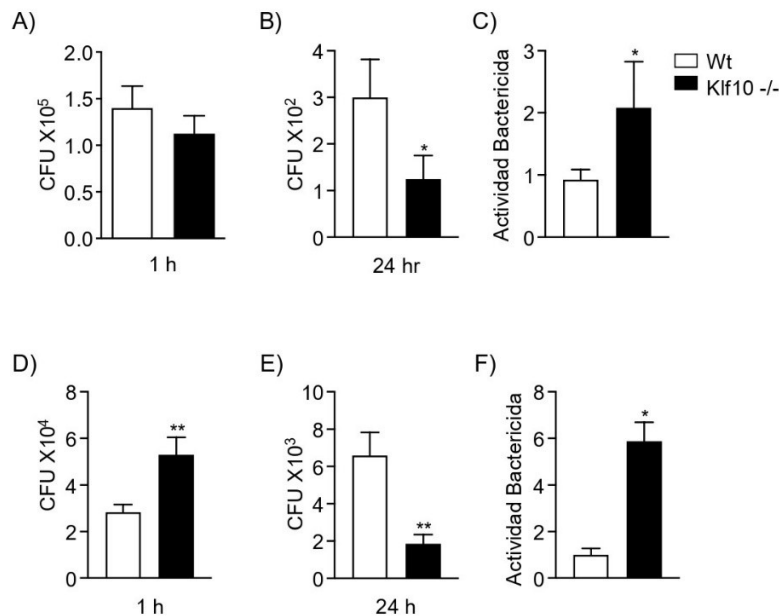
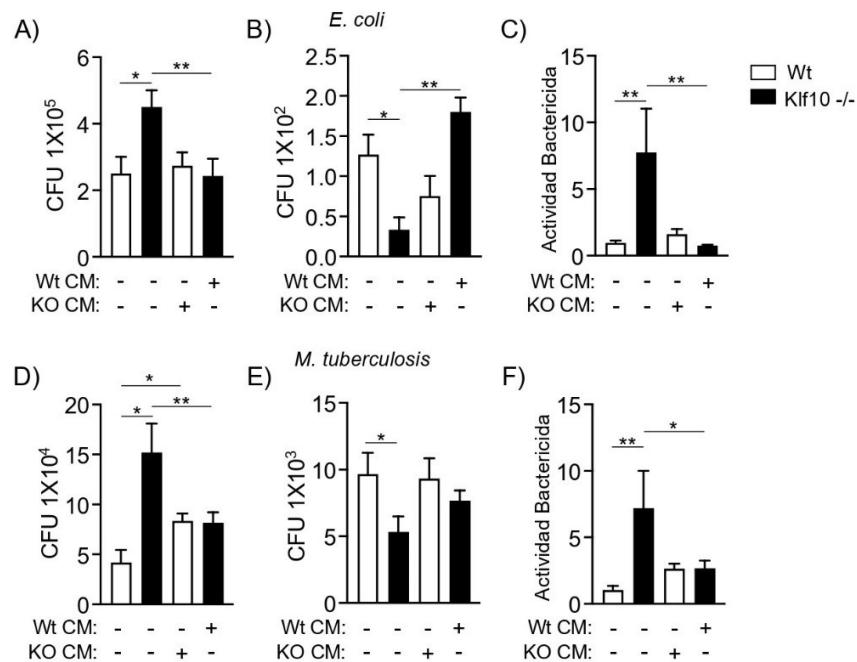


Figura 3.- Los MDM *Klf10*<sup>-/-</sup> muestran una mejor actividad fagocítica y bactericida frente a *Mycobacterium tuberculosis* patógena y no patógena. Se infectaron 4X10<sup>5</sup> MDM (Wt) o deficientes en (*Klf10*<sup>-/-</sup>) con *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) (A). El número de micobacterias fagocitadas después de 1 hora se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos (B). El número de micobacterias supervivientes después de 24 h de infección se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos (C). Gráfico que muestra la actividad bactericida. Se infectaron 4X10<sup>5</sup> MDM con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1(D). El número de micobacterias fagocitadas después de 1 hora se determinó cultivando bacterias a partir de lisados macrófagos (E). El número de micobacterias supervivientes después de 24 h de infección se determinó mediante el cultivo de bacterias a partir de lisados de macrófagos (F). Gráfico que muestra la actividad bactericida (F). Los datos representan la media ± sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,01, \*\*P<0,001 se determinaron mediante la prueba t no pareada.

fueron muy similares a la de los macrófagos Wt. Por el contrario, el cultivo de macrófagos Wt en el medio condicionado de macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> no mejoró su actividad fagocítica (Fig. 4A), pero mejoró considerablemente su actividad bactericida (Fig. 4B y 4C). Asimismo, cuando los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> se cultivaron en el medio condicionado de macrófagos Wt, tanto su capacidad fagocítica (Fig. 4D) como bactericida (Fig. 4E y 4F) contra *M. tuberculosis* se redujeron significativamente a niveles similares a los de macrófagos Wt. Nuevamente, el cultivo de macrófagos Wt en el medio condicionado de macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> mejoró ligeramente su actividad fagocítica (Fig. 4D) y bactericida (Fig. 4E y 4F) contra *M.*

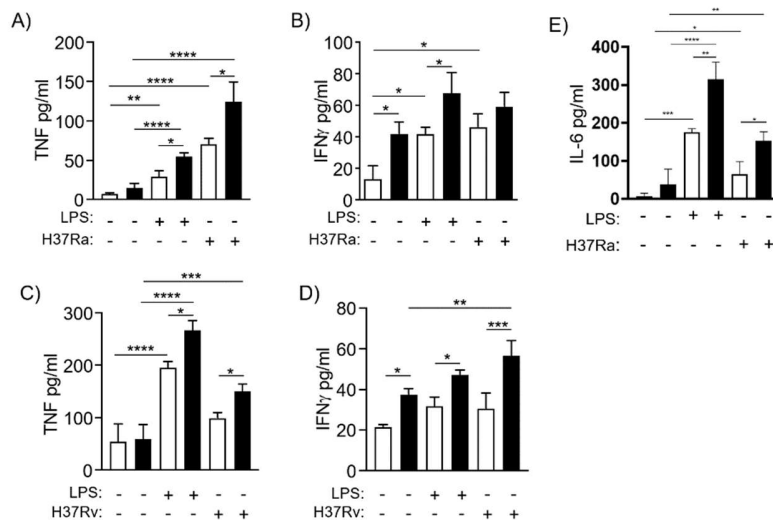
*tuberculosis*. Juntos, estos resultados sugieren que los macrófagos deficientes en KLF10 producen factores solubles que favorecen las actividades fagocíticas y bactericidas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.



**Figura 4.- Un factor secretado promueve las actividades fagocíticas y bactericidas potenciadas de los macrófagos deficientes de Klf10.** Los MDM silvestres (Wt) y deficientes de KLF10 (Klf10<sup>-/-</sup>) se cultivaron durante 24 h. Posteriormente, se recogió el medio de cultivo, las células se lavaron extensamente con PBS. Luego, los MDM Wt se cultivaron en medios condicionados (CM) de Klf10<sup>-/-</sup> MDM (KO), mientras que los MDM Klf10<sup>-/-</sup> se cultivaron con medios condicionados de Wt MDM durante 24 horas. A continuación, las células se infectaron con *E. coli* (MOI 10:1) (A-C) o con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D-F). Para la infección por *E. coli*, la cantidad de *E. coli* fagocitada se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 1 hora después de la infección (A). La cantidad de *E. coli* supervivientes se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 3.5 horas después de la infección (B), y se calculó la actividad bactericida (C). Para la infección por *M. tuberculosis*, el número de *M. tuberculosis* fagocitados se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 1 hora después de la infección (D). El número de *M. tuberculosis* supervivientes se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 24 horas después de la infección (E) y se calculó la actividad bactericida (F). Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001 se determinaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Dado que TNF e IFN $\gamma$  favorecen la activación de los macrófagos, potenciando la captura y destrucción de patógenos al promover la macropinocitosis (BoseDasgupta and Pieters, 2014),

evaluamos la presencia de estas citoquinas inflamatorias en el medio de cultivo de MDM sin estímulo o estimuladas. Similar a lo reportado previamente (Papadakis et al., 2015b), los niveles de TNF (Fig. 5A y 5C) e IL-6 (Fig. 5E) no fueron diferentes entre los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> y Wt sin estimular. Sin embargo, observamos que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> produjeron más TNF en respuesta a LPS, *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* H37Rv en comparación con los macrófagos Wt (Fig. 5A y 5C). En contraste con TNF, encontramos que el IFN $\gamma$  secretado por los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> sin estimular, era casi el doble que el de los macrófagos Wt sin estímulo (Fig. 5B y 5D). Además, observamos que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> produjeron más IFN $\gamma$  en respuesta a LPS (Fig. 5B y 5D). A diferencia de la infección por *M. tuberculosis* H37Ra que promovió muy poco la secreción de IFN $\gamma$  por los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> (Fig. 5B), los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> infectados con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv produjeron niveles más altos de IFN $\gamma$  que los macrófagos Wt (Fig. 5D).



**Figura 5.- Los macrófagos deficientes en *Klf10* no estimulados o estimulados produjeron más IFN $\gamma$  que los macrófagos Wt.**  $4 \times 10^5$  BMDM se dejaron sin tratar (-), se estimularon con LPS (100 ng/ml), se infectaron con *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) o se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) durante 1 h, como se describió en materiales y métodos. Los niveles de TNF (A y C), IFN $\gamma$  (B y D) e IL-6 secretados a los medios de cultivo se determinaron mediante ELISA 24 h después de la infección. Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  se determinaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Finalmente, para confirmar que la capacidad fagocítica mejorada de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> está mediada por IFN $\gamma$ , tratamos los MDM con un anticuerpo anti-IFN $\gamma$  12 horas antes de la infección de *E. coli* o *M. tuberculosis*. Curiosamente, el tratamiento de los macrófagos Wt

con el anticuerpo anti-IFN $\gamma$  no afectó su capacidad fagocítica o destructiva hacia *E. coli* (Fig. 6A–6C) o *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 6D–6F). En cambio, la capacidad fagocítica de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> después de haber sido tratados con anti-IFN $\gamma$ , fue similar a la de los macrófagos Wt cuando se infectaron con *E. coli* (Fig. 6A), pero no afectó la capacidad fagocítica de *M. tuberculosis* (Fig. 6D). No obstante, el bloqueo de IFN $\gamma$  disminuyó considerablemente la capacidad destructiva de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> (Fig. 6C y 6F), casi duplicando o cuadruplicando el número de *E. coli* (Fig. 6B) y *M. tuberculosis* (Fig. 6E) sobrevivientes, respectivamente. Estos resultados muestran que las capacidades fagocíticas y destructivas aumentadas de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> son mediadas por IFN $\gamma$ , lo que sugiere que estos macrófagos pueden internalizar bacterias a través de macropinocitosis. Para confirmar esta hipótesis se utilizó *S. typhimurium*, que, a diferencia de *E. coli* o *M. tuberculosis*, invade las células huésped, incluidos los macrófagos, al promover la macropinocitosis (Alpuche-aranda et al., 1994; Rosales-Reyes et al., 2012). De acuerdo a la hipótesis, el número de *S. typhimurium* internalizado (Fig. 6G) o de bacterias sobrevivientes (Fig. 6H), fueron similares entre los macrófagos Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> independientemente de la cepa de Salmonella utilizada.

Juntos, nuestros datos indican que la mayor captura y destrucción de patógenos mostrada por los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> depende de IFN $\gamma$  el cual cambia el mecanismo de intercalación de los macrófagos hacia la macropinocitosis.

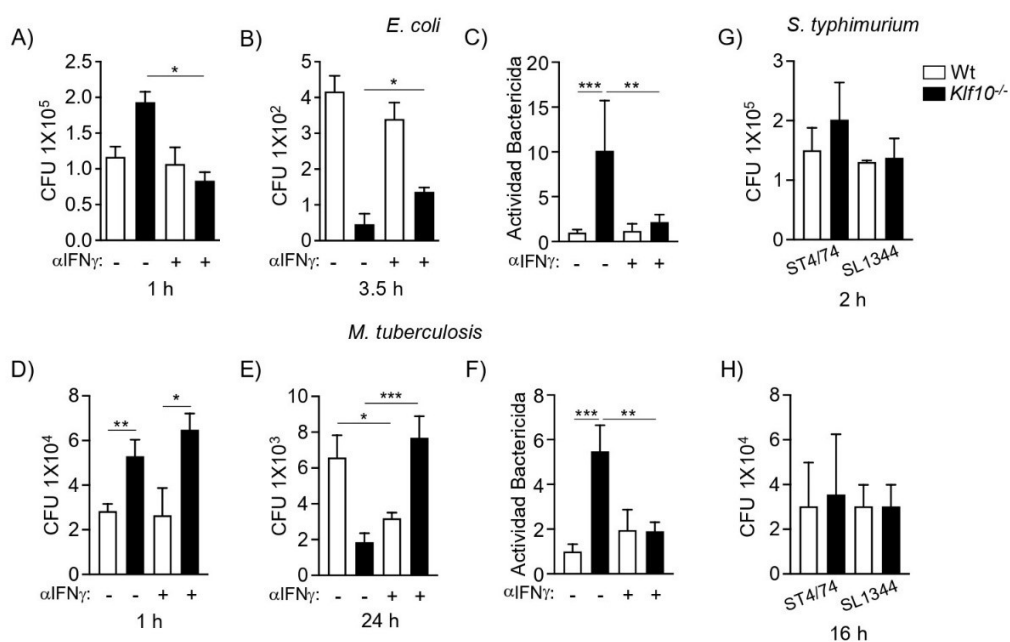


Figura 6.- **El IFN $\gamma$  regula la actividad fagocítica y bactericida potenciada de los macrófagos deficientes en Klf10.** Se trataron  $1.5 \times 10^5$  MDM con anticuerpos anti-IFN $\gamma$  (500 ng/ml) o control de isotipo (-) durante 12 h antes de la infección con *E. coli* (MOI 10:1) (A-C), o con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D-F). El número de *E. coli* (A) o *M. tuberculosis* H37Rv (D) fagocitadas se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 1 hora después de la infección. El número de bacterias supervivientes de *E. coli* (B) o *M. tuberculosis* H37Rv (E) y la actividad bactericida frente a *E. coli* (C) o *M. tuberculosis* H37Rv (F) se determinó mediante el cultivo de bacterias a partir de lisados de macrófagos en los tiempos indicados. Se infectaron  $2 \times 10^5$  MDM de Wt o Klf10<sup>-/-</sup> con cepas de *Salmonella typhimurium* ST4/74 o SL1344 (MOI 10:1). El número de *S. typhimurium* fagocitados se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 2 h después de la infección (G). El número de *S. typhimurium* supervivientes se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 16 h después de la infección (H). Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001. A-F se determinaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. G y H se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Tukey

## Los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> cambian su mecanismo de internalización hacia la macropinocitosis

Para confirmar que los efectos antimicrobianos aumentados de los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> se deben al cambio del mecanismo para endocitar de fagocitosis a macropinocitosis, inhibimos este último proceso tratando los macrófagos con colchicina durante 30 minutos antes de la infección con *E. coli* o *M. tuberculosis*. La inhibición de la macropinocitosis provocó una disminución drástica en la capacidad de los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> para endocitar bacterias, internalizando aproximadamente un 50 % menos de *E. coli* (Fig. 7A) y aproximadamente un 60 % menos de *M. tuberculosis* (Fig. 7D), mientras que los macrófagos Wt no se vieron afectados por el tratamiento con colchicina (Fig. 7A y 7D). Al medir la capacidad destructiva, encontramos que los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> tratados con colchicina fueron menos eficientes en la destrucción de *E. coli* que los macrófagos no tratados o los macrófagos Wt no tratados o tratados con colchicina (Fig. 7B y 7C). Aunque el número de *M. tuberculosis* que sobrevivió en los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> tratados con colchicina fue similar al encontrado en los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> no tratados (Fig. 7E), el número de micobacterias inicialmente internalizadas y el de las bacterias restantes después de 24 h indicó que la colchicina redujo la capacidad de los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> para destruir *M. tuberculosis* (Fig. 7F).

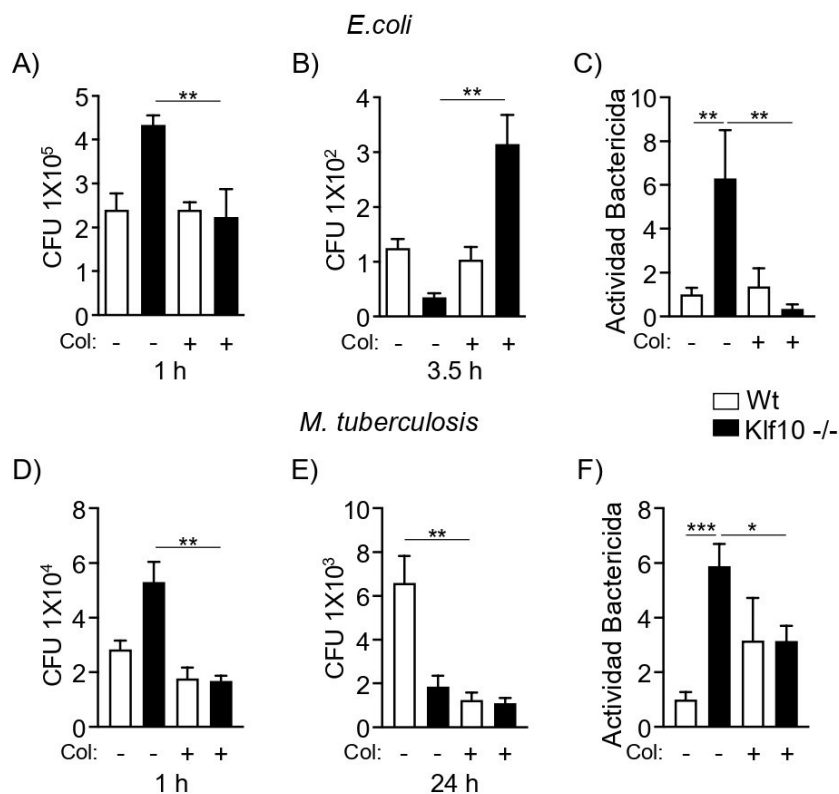


Figura 7.- **La colchicina reduce las propiedades fagocíticas y destructivas de los macrófagos deficientes en Klf10.**  $1.5 \times 10^5$  (Wt) o deficientes en Klf10 (Klf10<sup>-/-</sup>) se dejaron sin tratar (-) o se trataron con 100  $\mu\text{g/ml}$  de colchicina (Col) durante 30 min antes de la infección con *E. coli* (MOI 10:1) (A-C) o *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D-F). El número de *E. coli* (A) o *M. tuberculosis* H37Rv (D) fagocitadas se determinó cultivando bacterias a partir de lisados de macrófagos 1 hora después de la infección. El número *E. coli* supervivientes (B) o de *M. tuberculosis* H37Rv (E) se determinó mediante el cultivo de bacterias a partir de lisados de macrófagos en los tiempos indicados y se determinó la actividad bactericida contra *E. coli* (C) o *M. tuberculosis* H37Rv (F) \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . A-F se determinaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Considerando que: i) el reclutamiento de coronina 1 a los fagosomas durante la internalización de *M. tuberculosis* por macrófagos impide la maduración del fagosoma, favoreciendo así la supervivencia y proliferación de *M. tuberculosis* (Jayachandran et al., 2007); ii) el  $\text{IFN}\gamma$  promueve la translocación de coronina 1 de la membrana celular al citosol a través de un mecanismo dependiente de la proteína cinasa C (PKC), ocasionando que los macrófagos internalicen bacterias por macropinocitosis y no por fagocitosis (BoseDasgupta and Pieters, 2014) mejorando la capacidad destructiva de los macrófagos frente a patógenos; y iii) los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> sin estimular producen  $\text{IFN}\gamma$  (Fig. 5B y 5D), evaluamos la localización celular de la coronina 1. Los macrófagos Wt mostraron una distribución homogénea de coronina 1 alrededor de la célula que colocaliza con la actina subcortical (Fig. 8A, paneles superiores izquierdos), mientras que los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> mostraban grandes

áreas de membrana desprovistas de coronina1, que colocaliza con actina en los seudópodos (Fig. 8A, paneles inferiores izquierdos). Como se reportó anteriormente (BoseDasgupta and Pieters, 2014), la exposición a PMA translocó la coronina 1 de la membrana celular al citosol en los macrófagos Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> (Fig. 8A, paneles superior e inferior derechos).

Para confirmar que la coronina 1 en macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> se encuentra fosforilada, los extractos proteicos totales de los macrófagos se resolvieron utilizando un gel SDS-PAGE en presencia de Phostag, una molécula funcional que se une a proteínas fosforiladas en residuos de serina y treonina, lo que retrasa su movilidad en SDS-PAGE (Kinoshita et al., 2009). La separación de los extractos de proteínas de los macrófagos Wt en Phostag-SDS-PAGE reveló que la coronina 1 se encontró principalmente como una banda de migración rápida, aunque también fue evidente una banda débil de migración lenta (Fig. 8B panel superior); como se esperaba, la exposición de los macrófagos Wt a PMA cambió claramente la migración de la coronina 1, lo que indica la fosforilación de la coronina 1 (Fig. 8B, panel superior). A diferencia de los macrófagos Wt sin estimular, en los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup>, la coronina 1 se encontró principalmente fosforilada como una banda de migración lenta, y la exposición a PMA no afectó más su migración (Fig. 8B panel superior). En condiciones normales de SDS-PAGE, la coronina 1 se resolvió como una sola banda con el peso molecular esperado (55 kDa) en macrófagos tratados con PMA y sin tratar, independientemente de su genotipo (Fig. 7H, panel central). Juntos, estos resultados indican que el IFN $\gamma$  secretado por macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> promueve la macropinocitosis de manera autocrina al modular la fosforilación de la coronina 1 y modulando su distribución dentro de la célula. De acuerdo con esta idea, prevenir la señalización de IFN $\gamma$  en macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup>, utilizando un anticuerpo bloqueante anti-IFN $\gamma$ , restauró la distribución de membrana de coronina 1 (Fig. 8C).

Finalmente, para confirmar que los MDM *Klf10*<sup>-/-</sup> cambiaron a macropinocitosis, analizamos la morfología de los macrófagos antes y después de la infección por *M. tuberculosis* mediante microscopía electrónica de transmisión. Congruente con los datos mostrados anteriormente, la morfología de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> en reposo coincidió con la de macrófagos activados, presentando un mayor número de prolongaciones las cuales a su vez también eran más largas en comparación con la de los macrófagos Wt así como una mayor formación de extensiones característica de macropinocitosis (Swanson, 2008) (Fig. 9A, paneles superiores).



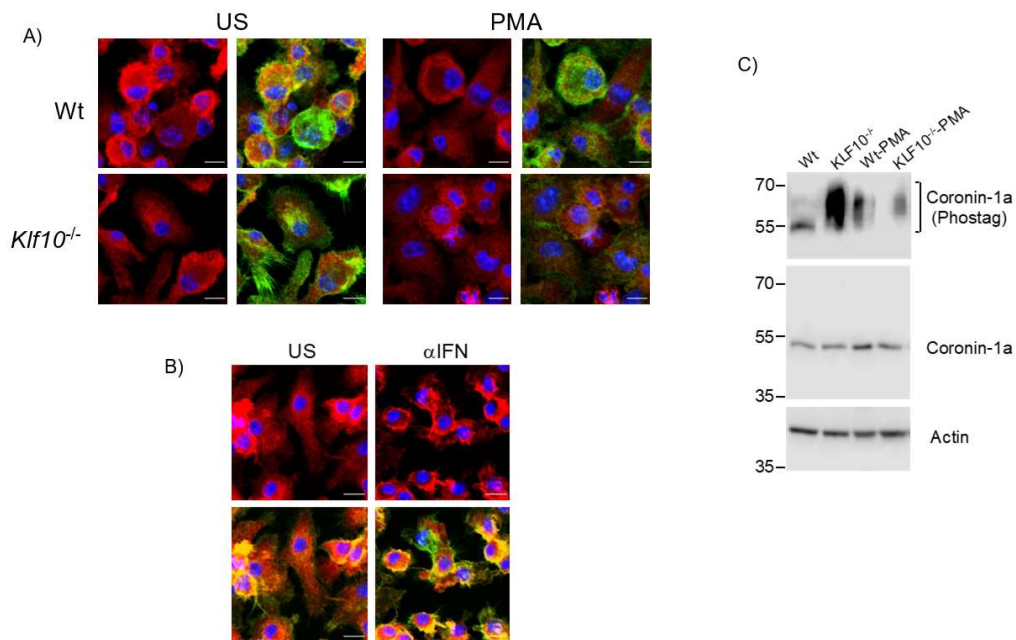


Figura 8.- **La ausencia de Klf10 cambia el mecanismo de internalización de los macrófagos a macropinocitosis.**  $5 \times 10^4$  MDM Wt o  $Klf10^{-/-}$  MDM se dejaron sin tratar (US), (paneles de la izquierda) o se trataron con PMA (50 ng/ml) (paneles de la derecha) durante la noche. Las células se fijaron y tiñeron como se describe en materiales y métodos y se analizaron mediante microscopía confocal (A). Las imágenes se tomaron a 40x con un zoom de 5x. La coronina 1 (roja) se visualizó usando anticuerpos específicos. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul) y actina con faloidina (verde). La barra representa 10  $\mu$ m. Extractos proteicos (30  $\mu$ g) preparados de macrófagos sin tratar (US) silvestres (Wt) o deficientes en KLF10  $Klf10^{-/-}$  o tratados con PMA (50 ng/ml) durante la noche. Se resolvieron 30  $\mu$ g de extractos de células totales en geles SDS-PAGE regulares (panel de en medio e inferior) o en geles que contenían Phostag (panel superior) 50  $\mu$ M y MnCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M. Los niveles de coronina 1 y actina se determinaron usando anticuerpos específicos. (A) Los MDM deficientes en KLF10 ( $Klf10^{-/-}$ ) se trataron con anticuerpos anti-IFN $\gamma$  (500 ng/ml) o de control de isotipo (-) durante 12 h. Las células se fijaron y tiñeron como se describe en materiales y métodos y se analizaron mediante microscopía confocal (C). Las imágenes se tomaron a 40x con un zoom de 5x. La coronina 1 (roja) se visualizó usando anticuerpos específicos. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul) y actina con faloidina (verde). La barra representa 10  $\mu$ m. Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . A-F se determinaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Tras la exposición a *M. tuberculosis*, los macrófagos Wt y  $Klf10^{-/-}$  aumentaron el número y la longitud de los procesos de la membrana (Fig. 9A, paneles inferiores); sin embargo, los cambios en los macrófagos  $Klf10^{-/-}$  fueron más dramáticos, presentando pseudópodos más largos (Fig. 9B). De acuerdo con los cambios morfológicos observados 15 minutos después de la infección, los macrófagos  $Klf10^{-/-}$  capturaron más *M. tuberculosis* que los macrófagos Wt. Los macrófagos  $Klf10^{-/-}$  capturaron tres veces más bacterias que los macrófagos Wt en

60 minutos (Fig. 9C). Curiosamente, esta capacidad mejorada para internalizar a *M. tuberculosis* no fue acompañada de un aumento en el número de lisosomas (Fig. 9D). Juntos, estos datos muestran que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> cambian a macropinocitosis a través de la producción y secreción de IFN $\gamma$  de forma autocrina.

## Los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> son resistentes a la infección por *Mycobacterium*

Para evaluar la capacidad destructiva de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> *in vivo*, infectamos ratones por vía intratraqueal con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y determinamos las cargas bacterianas 14 y 28 días después de la infección. Las cargas bacterianas pulmonares entre los ratones Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> fueron similares 14 días después de la infección (Fig. 9E). Sin embargo, la carga bacteriana pulmonar de los ratones Wt se triplicó 28 días después de la infección (Fig. 9E). De manera interesante, la carga bacteriana de los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> no aumentó significativamente y fue considerablemente más baja que la de los ratones Wt (Fig. 9E). De acuerdo con las cargas bacterianas observadas 28 días después de la infección. Los ratones Wt murieron 43 días después de la infección, mientras que solo el 30 % de los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> murieron al final del experimento (Fig. 9F). Estos datos muestran que los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> son eficaces para controlar la infección por *M. tuberculosis* H37Rv. Hasta el momento, nuestros resultados indican que en la ausencia de *Klf10* *M. tuberculosis* no puede montar una infección exitosa.

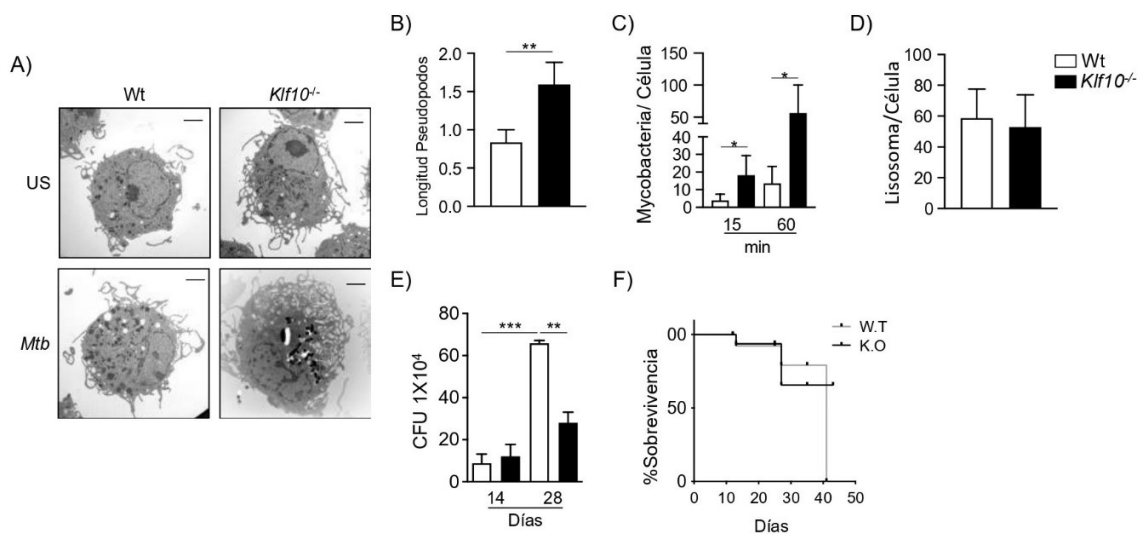


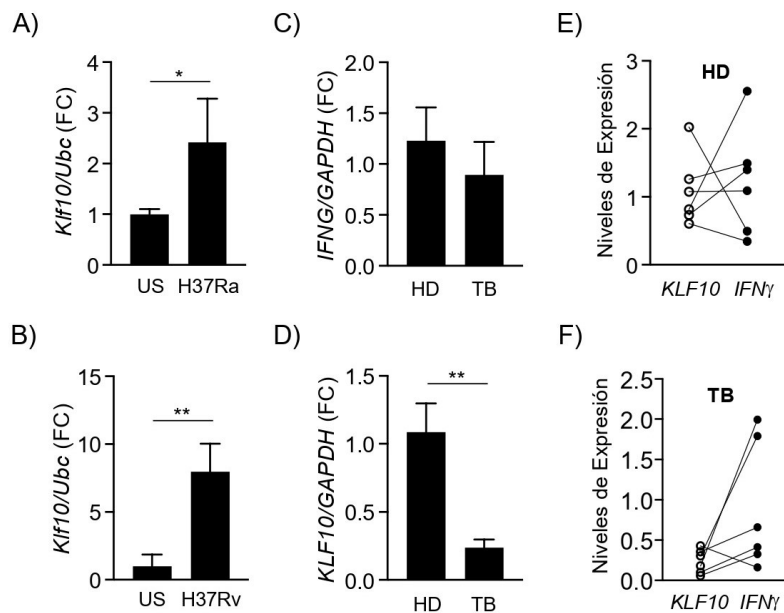
Figura 9.-Los macrófagos deficientes en *Klf10* muestran cambios morfológicos característicos de la macropinocitosis y una mayor actividad de eliminación frente a *M. tuberculosis* H37Rv.  $2.5 \times 10^6$  MDM Wt o *Klf10*<sup>-/-</sup> no fueron estimulados (US) o se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (Mtb) durante el tiempo indicado. Las células se fijaron y procesaron para microscopía electrónica de transmisión como se describe en materiales y métodos. (A) Micrografías electrónicas representativas (15 min después de la infección); la barra representa 2  $\mu$ m. (B) Longitud de los pseudópodos ( $\mu$ m). (C) Número de micobacterias por célula. (D) Número de lisosomas por célula. (E) Se infectaron ratones C57BL/6 Wt y *Klf10*<sup>-/-</sup> con *M. tuberculosis* H37Rv ( $2.5 \times 10^5$ ) por vía intratraqueal. La carga bacteriana pulmonar se determinó 14 y 28 días después de la infección (n=3 animales por tiempo de infección). (F) Curva de supervivencia, los ratones que mostraban signos de enfermedad (postración y pérdida de peso corporal) se sacrificaron el día 43 (n=6 por grupo). Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001. B y D se determinaron mediante la prueba t no pareada. C y E se determinaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### ***M. tuberculosis* modula la expresión del gen *Klf10* en macrófagos infectados.**

Para determinar si *M. tuberculosis* altera la expresión del gen *Klf10* durante la infección de los macrófagos, se infectaron macrófagos alveolares de ratones MH-S con *M. tuberculosis* H37Ra o H37RV, y se determinaron los niveles de ARNm de *Klf10* mediante RT-qPCR. Tan pronto como 2 horas después de la infección los macrófagos presentaron, un aumento del doble en los niveles de ARNm de *Klf10* en respuesta a la cepa no patógena de *M. tuberculosis* H37Ra (Fig. 10A), mientras que en respuesta a la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv los niveles de ARNm de *Klf10* aumentaron aún más, casi 4 -5 veces más que los niveles basales (Fig. 10B).

Para evaluar el papel de KLF10 en la expresión del gen que codifica para IFN $\gamma$  en la tuberculosis, determinamos los niveles de ARNm de *KLF10* e *IFN $\gamma$*  en células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos y pacientes con TB activa mediante qPCR. De acuerdo con los datos previamente publicados (Zhang et al., 1995), no encontramos diferencias en los niveles de ARNm de *IFN $\gamma$*  entre donantes sanos y pacientes con TB (Fig. 10C). En cambio, los niveles de ARNm de *KLF10* se redujeron en pacientes con TB en comparación con los de donantes sanos (Fig. 10D). A continuación, determinamos cómo los niveles de ARNm de *KLF10* e *IFN $\gamma$*  variaban entre donantes sanos y pacientes con TB y notamos que los donantes sanos o pacientes con TB con niveles más altos de ARNm

de *KLF10* mostraron los niveles más bajos de ARNm de *IFN $\gamma$* , mientras que los pacientes con niveles más bajos de ARNm de *KLF10* mostraron niveles elevados del mensajero de *IFN $\gamma$*  (Fig. 10E y 10D). Debido al número limitado de muestras y la falta de acceso a macrófagos alveolares de pacientes con TB, no pudimos establecer una correlación negativa entre *KLF10* y la expresión de *IFN $\gamma$*  en pacientes con TB. En conjunto, nuestros datos sugieren fuertemente que Klf10 media la regulación negativa sobre la producción de *IFN $\gamma$*  provocada por *M. tuberculosis*, lo que previene el cambio a macropinocitosis, favoreciendo así la supervivencia de *M. tuberculosis* y la infección del huésped.



**Figura 10.- Expresión de KLF10 en macrófagos alveolares murinos infectados con *M. tuberculosis* y células de sangre periférica de pacientes con TB activa.**  $2.5 \times 10^5$  macrófagos alveolares MH-S se dejaron sin estimular (US) o se infectaron con *M. tuberculosis* H37Ra (A) o H37Rv (B) durante 2 horas. Se aisló el ARN y se determinaron los niveles de ARNm de *Klf10* mediante qPCR (n=3). Se aislaron células mononucleares periféricas de donantes sanos (HD) o de pacientes con tuberculosis (TB) activa. Se aisló el ARN y se determinaron los niveles de ARNm de *IFN $\gamma$*  (C) y *KLF10* (D) mediante qPCR (n=6). Niveles de ARNm de *KLF10* e *IFN $\gamma$*  en células mononucleares periféricas de donantes sanos (E) y pacientes con TB activa (F), con líneas que conectan datos del mismo individuo. FC, cambio de pliegue; AU, unidades arbitrarias. Los datos representan la media  $\pm$  sd de al menos tres experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001. A-D se determinaron mediante la prueba t no pareada.

## Discusión

*M. tuberculosis* es el agente infeccioso que más muertes ha causado en el mundo. Si bien existe una vacuna y tratamientos de primera, segunda y tercera línea, un tercio de la población mundial aún está infectada con este bacilo (Fine, 1998; Maher and Nunn, 1998; Yew, 1999). *M. tuberculosis* ha desarrollado estrategias para evitar ser destruida por los sistemas inmunitarios innato y adaptativo (Baena and Porcelli, 2009; Bhatt and Salgame, 2007). Es importante destacar que *M. tuberculosis* promueve el establecimiento de un entorno antiinflamatorio al atenuar la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, y al aumentar la expresión de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF $\beta$  para reducir la proliferación y actividad destructiva de los macrófagos y la activación de la respuesta inmune adaptativa (Othieno et al., 1999; Villaseñor et al., 2019).

Generalmente, los macrófagos son eficaces para detectar, controlar y destruir a *M. tuberculosis*, ya sea mediante la fusión de los fagolisosomas los cuales contienen y destruyen a la bacteria o encapsulando *M. tuberculosis* en apoptosomas para que puedan ser reconocidos por otras células fagocíticas y activar el sistema inmunitario adaptativo (Lamkanfi and Dixit, 2010; Srinivasan et al., 2014). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, *M. tuberculosis* evita la destrucción (Behar et al., 2010). Aunque varios estudios han discutido el mecanismo molecular desplegado por *M. tuberculosis* para la supervivencia y proliferación dentro de los fagosomas, se sabe poco sobre la regulación genética de las células huésped inducida por *M. tuberculosis* para promover su supervivencia y el establecimiento de un entorno antiinflamatorio que sostiene la infección.

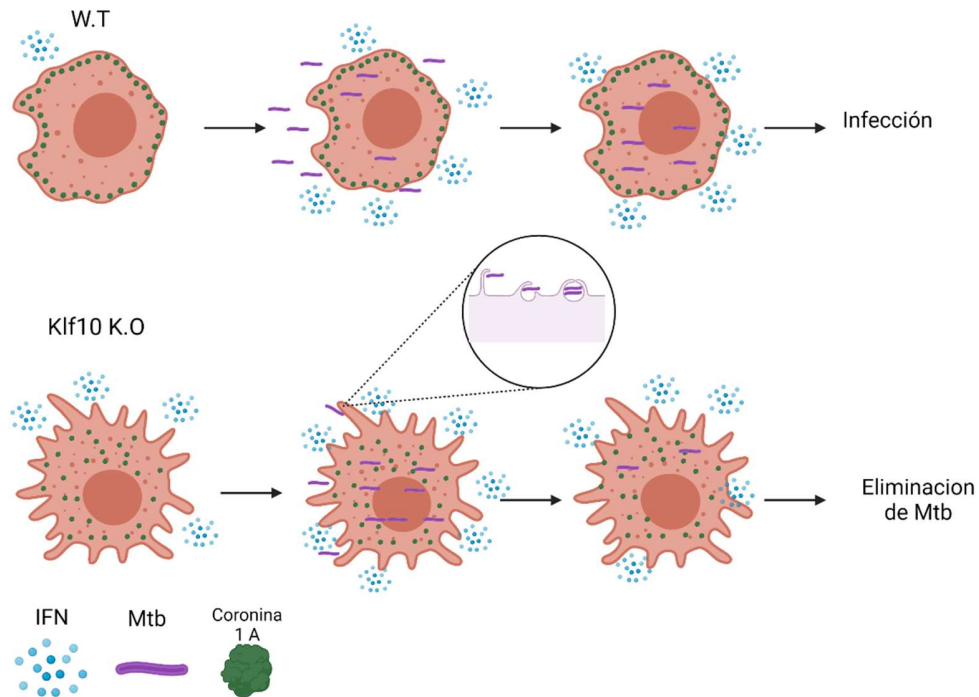
En este estudio, describimos un papel novedoso para el factor transcripcional Klf10 en la destrucción de patógenos y el desarrollo de enfermedades infecciosas. Previamente se ha reportado que la inactivación de Klf10 induce inflamación sistémica (Huang et al., 2016; Papadakis et al., 2015b).

Papadakis et al. encontraron que los macrófagos del colon de ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> mostraban un fenotipo activado, expresando altos niveles de Ly6c y produciendo más TNF e IL-6 en respuesta a LPS que los macrófagos Wt (Huang et al., 2016; Papadakis et al., 2015a). Congruente con esto, encontramos que además de la estimulación con LPS, tras la infección

con *M. tuberculosis* se incrementa el número de MDM Klf10<sup>-/-</sup> que expresan Ly6c que si bien esto también ocurre en los MDM Wt infectados, el incremento es menor, y los macrófagos Ly6c<sup>+</sup> Klf10<sup>-/-</sup> presentan niveles más altos de Ly6c en la superficie que los macrófagos Ly6c<sup>+</sup> Wt. Además, encontramos que los MDM Klf10<sup>-/-</sup> infectados con *M. tuberculosis* produjeron más TNF e IL-6 que los macrófagos Wt infectados, lo que demuestra que los MDM Klf10<sup>-/-</sup> alcanzan un estado de activación más alto que los MDM Wt en respuesta a diferentes estímulos. De acuerdo con esta idea, nuestros datos muestran, por primera vez, que los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> son más eficientes en la eliminación de bacterias, tanto: *E. coli*, como las cepas no virulentas (H37Ra) y virulentas (H37Rv) de *M. tuberculosis*, que los macrófagos Wt. Dado que los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> producen el doble de IFN $\gamma$  que los macrófagos Wt sin ser previamente estimulados, encontramos que la mayor actividad fagocítica y bactericida mostrada por los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> en reposo se debió a una mayor producción basal de IFN $\gamma$ , ya que al utilizar los medios condicionados de macrófagos Wt en el cultivo de macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> o al bloquear IFN $\gamma$  con anticuerpos específicos, disminuyó drásticamente su actividad bactericida. Estos resultados sugieren que Klf10 regula negativamente la expresión de IFN $\gamma$  en macrófagos *naive*, evitando así el establecimiento de un entorno inflamatorio no deseado en condiciones homeostáticas (Esquema 5). De acuerdo con esta idea, mediante el análisis bioinformático encontramos que el promotor de IFN $\gamma$  de ratón contiene cuatro sitios de unión potenciales para Klf10, tres de los cuales son cajas CACCC (Esquema 4). Además, el elemento ubicado a -281 pb desde el sitio de inicio de la transcripción se conserva en el promotor de IFN $\gamma$  humano (Fig. 10). De acuerdo con esto, en el 2013 se descubrió que la unión de KLF10 a una caja CACCC ubicada a -256 pb del sitio de inicio de la transcripción en el promotor IL-12p40 suprime la transcripción (Zhang et al., 2013). Además, la sobreexpresión de Klf10 en los linfocitos T reguladores disminuye la producción de IFN $\gamma$  (Cao et al., 2009b). Esto sugiere que Klf10 puede inhibir directamente la expresión del gen IFN $\gamma$  uniéndose a los elementos CACCC en el promotor de IFN $\gamma$  y también indirectamente a través de la activación de linfocitos reguladores. Dado que los niveles de IFN $\gamma$  en los macrófagos Klf10<sup>-/-</sup> aumentaron aún más con la infección por *M. tuberculosis* que los de los macrófagos Wt, *M. tuberculosis* podría afectar la expresión de IFN $\gamma$  a través de Klf10 de inducir su unión al promotor de IFN $\gamma$  y atenuar la activación de los macrófagos, evitando así su destrucción, lo cual se está investigando actualmente.

El TNF y el IFN $\gamma$  son citocinas que aumentan la capacidad de captura de material exógeno de los macrófagos y la actividad destructiva contra los patógenos invasores a través del cambio del mecanismo de internalización de fagocitosis a macropinocitosis, mediante la modulación de la distribución celular y la función de la coronina 1. La coronina 1 está asociada a la membrana celular de los macrófagos inactivados y su retención en la membrana del fagosoma durante la infección por *M. tuberculosis* impide la maduración del fagosoma y la destrucción de los bacilos (Jayachandran et al., 2007). Por el contrario, cuando los macrófagos son activados por TNF o IFN $\gamma$ , la coronina 1 se traslada al citoplasma de manera dependiente de PKC. La fosforilación de la coronina 1 en los residuos de serina y treonina también promueve su interacción con sortina nexina 5 (Snx5) para inducir la activación de PI3K y el inicio de la macropinocitosis (BoseDasgupta and Pieters, 2014). De acuerdo con esto, observamos que en los MDM *Klf10*<sup>-/-</sup> no estimulados, coronina 1 se encontraba fosforilada y por consecuencia, mayormente distribuida en el citoplasma. Sin embargo, como se había descrito previamente, la coronina 1 se encontraba asociada con la membrana celular en macrófagos Wt no estimulados y se encontró principalmente en su forma desfosforilada, mientras que la estimulación con PMA fosforiló y reubicó la coronina 1 en el citosol. Además, el bloqueo de la señalización de IFN $\gamma$  en los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> restableció la distribución de la membrana de la coronina 1 que se asemeja a los macrófagos Wt. Juntos, estos resultados sugieren que IFN $\gamma$  cambia el mecanismo de internalización de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> a macropinocitosis. Esta idea está respaldada por los experimentos de inhibición de la macropinocitosis, mediante los cuales se encontró que la exposición de los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> a la colchicina antes de la infección disminuyó sus funciones fagocíticas y bactericidas. Además, el análisis de microscopía electrónica reveló que los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> sin estímulo presentaban numerosos y largos pseudópodos que aumentaron tanto en número y longitud con la infección por *M. tuberculosis*. La longitud de los pseudópodos de macrófagos Wt también aumentó cuando se expusieron a *M. tuberculosis*; sin embargo, fueron menores y más cortos que los observados en los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> (Esquema 5). Además, los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> infectados con *Salmonella* mostraron una actividad fagocítica y bactericida similar a la de los macrófagos Wt, lo que está de acuerdo con el hecho de que, a diferencia de *E. coli* o *M. tuberculosis*, *Salmonella* induce la formación de pseudópodos en la superficie y la macropinocitosis, para encapsularse y persistir en un

fagosoma espacioso (Francis et al., 1993).



Esquema 5.-Los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup> son más eficientes para destruir a *M. tuberculosis*. Los macrófagos *Klf10*<sup>-/-</sup>, producen más IFN $\gamma$  a niveles basales en comparación con los macrófagos silvestres. El IFN $\gamma$  induce la fosforilación de coronina 1, cuando coronina es fosforilada se encuentra dispersa en el citoplasma, activa la vía de PI3K. Esto desencadena un re arreglo en el cito esqueleto cambiando la forma de internalización de cargo, de fagocitosis a macropinocitosis mecanismo por el cual *M. tuberculosis* es destruido de manera más eficiente

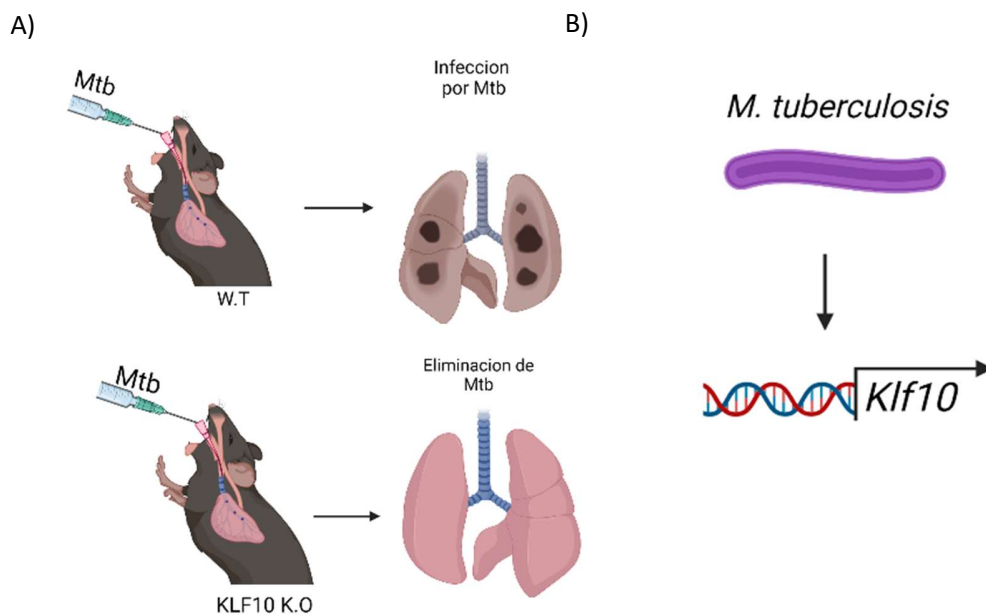
De acuerdo con que: El IFN $\gamma$  juega un papel importante en el control de la TB (Donovan et al., 2017; Zhang et al., 2018) y que el aumento de los niveles de IFN $\gamma$  *in vivo* induce una respuesta inmunitaria protectora contra cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (Mata-Espinosa et al., 2008), nuestros experimentos *in vivo* demostraron que los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> controlaban la infección por *M. tuberculosis* al reducir significativamente la carga bacteriana pulmonar. El día 28 después de la infección por *M. tuberculosis*, la carga bacteriana pulmonar de los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> fue un tercio de la de los animales Wt. Además, los ratones Wt



C57BL/6 no sobrevivieron a la infección por *M. tuberculosis* más allá de los 40 días, mientras que los ratones *Klf10*<sup>-/-</sup> sobrevivieron y no mostraron signos de enfermedad (Esquema 6). Por lo tanto, estos datos sugieren que *Klf10* juega un papel importante en la regulación del cambio del mecanismo de internalización de los macrófagos a macropinocitosis, necesario para la respuesta innata contra las bacterias y que es relevante en el desarrollo de TB, específicamente que *Klf10* a través de regular negativamente la expresión de *IFN*γ previene la macropinocitosis.

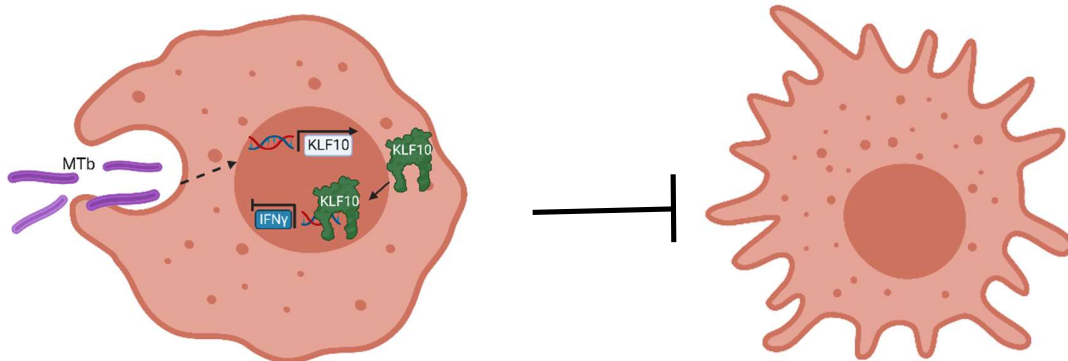
De manera congruente con esos hallazgos, nuestros datos indican que *M. tuberculosis* induce la expresión de *Klf10* en macrófagos bronco-alveolares de ratón, (esquema 6) esto en conjunto con datos previamente publicados que muestran niveles aumentados de ARNm de *KLF10* en macrófagos humanos de bazo, 6 horas después de la infección con aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (López-Agudelo et al., 2022) y en células de lavados broncoalveolares de primates no humanos infectados (Mehra et al., 2015), sugieren fuertemente que *M. tuberculosis* disminuye la producción de *IFN*γ en macrófagos infectados al promover la expresión de *KLF10*. A pesar de que nuestros datos apuntan a una correlación negativa entre *KLF10* y los niveles de ARNm de *IFN*γ en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB, es necesario aumentar la cantidad de muestra para confirmarlo. Además, encontramos niveles reducidos de ARNm de *KLF10* en células mononucleares de pacientes con TB activa en comparación con los niveles encontrados en individuos sanos. Esto concuerda con diferentes estudios transcriptómicos realizados en macrófagos obtenidos de pulmones de modelos de ratón infectados con *M. tuberculosis* (Looney et al., 2021; Plumlee et al., 2021) y lavados broncoalveolares (Lavalett et al., 2017; Pisu et al., 2021) de humanos, que encontraron niveles reducidos de ARNm de *KLF10* en comparación con ratones no infectados o individuos sanos, respectivamente. Los niveles reducidos de ARNm de *KLF10* en células de pacientes con TB activa podrían resultar de la regulación negativa de la expresión del *KLF10* mediada por IL-10 (Fueki et al., 2007), ya que se ha demostrado que las células mononucleares de pacientes con TB activa producen más IL-10 que las células obtenidas de pacientes con TB latente o donantes sanos tras estimulación con tuberculina (Tebruegge et al., 2015). Además, está bien establecido que en estadios avanzados de infección la IL-10 favorece el desarrollo de TB (Redford et al., 2011). En general, estos datos sugieren que la expresión de *Klf10* inducida por *M. tuberculosis* se

da en etapas tempranas, justo después de que los macrófagos se encuentran con *M. tuberculosis*, para asegurar la supervivencia de la micobacteria. Mientras que más tarde en la infección, donde la IL-10 contribuye la supervivencia de *M. tuberculosis* y la progresión de la enfermedad, los niveles de proteína y ARNm de KLF10 se reducen por mecanismos que aún no se han definido. Por lo tanto, se requieren más experimentos destinados a determinar la cinética de expresión de *KLF10* durante la infección in vivo de macrófagos por *M. tuberculosis*.



**Esquema 6.- *M. tuberculosis* induce la expresión de Klf10 como mecanismo de supervivencia.** A) Ratones deficientes en Klf10, infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, demostraron ser más eficientes para controlar la infección y destruir a la bacteria en comparación con los silvestres. B) *M. tuberculosis* induce la expresión de Klf10 en macrófagos alveolares de ratón 2 horas después de la infección.

## Conclusiones



**Esquema 5.- *Mycobacterium tuberculosis* induce la expresión de *Klf10* para promover su supervivencia.** Cuando el macrófago reconoce a *Mycobacterium*, la bacteria induce la expresión del factor transcripcional *Klf10*. Una vez traducido, *Klf10* se une al promotor de  $IFN\gamma$  Inhibiendo su transcripción, provocando que los macrófagos aledaños al sitio de infección no reciban las señales inflamatorias necesarias para que puedan cambiar de fagocitosis a macropinocitosis.

En este trabajo se caracterizó por primera vez el papel que juega *Klf10* en el desarrollo de la tuberculosis en un modelo murino. Es posible que condiciones similares se observen en otras enfermedades infecciosas, donde los macrófagos jueguen un papel relevante.

Nuestros datos muestran que *Mycobacterium tuberculosis*, por un mecanismo aún desconocido, induce la expresión del gen *Klf10*, lo cual conlleva a que conduce a *Klf10* inhiba la expresión de los genes que codifican para citocinas como TNF, IL-6 e  $IFN\gamma$ . Al no haber  $IFN\gamma$  en el medio, el cambio del proceso de internalización de fagocitosis a macropinocitosis de los macrófagos no es llevado a cabo, lo que favorece la infección de la bacteria en el organismo huésped.

Se ha considerado que durante la infección por *M. tuberculosis*, los linfocitos T, particularmente las células Th-1, son la fuente más importante de  $IFN\gamma$ . Sin embargo, nuestros resultados muestran por primera vez, que los macrófagos también son una fuente importante de  $IFN\gamma$  que, de forma autocrina, promueve una actividad fagocítica y letal más eficiente contra las micobacterias, y que la producción de  $IFN\gamma$  es regulada negativamente por *Klf10*.

Estos resultados abren un nuevo panorama en el área clínica y en la medicina genómica, ya que por primera se muestra a *Klf10* como un factor de regulación maestro, en un contexto

inflamatorio en el control de enfermedades infecciosas. El conocimiento adecuado de la regulación de este gen conllevaría a la generación de fármacos que pudiera auxiliar en un mejor control de la tuberculosis tanto en una fase aguda como en la crónica. Sin embargo, es necesario generar más conocimiento para que esto eventualmente sea empleado en el área clínica.

## **Conclusión**

*Mycobacterium tuberculosis*, por mecanismos aun desconocidos, induce la expresión de Klf10, este factor transcripcional con actividad dual, se une al promotor de IFN $\gamma$ , inhibiendo su producción. Al no recibir la señal inflamatoria de IFN $\gamma$ , no se induce la macropinocitosis en los macrófagos, por lo cual la bacteria no es destruida y continua la infección.

## Bibliografía

Alpuche-aranda, B.C.M., Esther, L., Swanson, J. a, and Miller, S.I. (1994). Stimulate Macrophage Macropinocytosis and Persist within Spacious Phagosomes By Celia M. Alpuche-Aranda,\* Esther L. gacoosin,~ Joel A. Swanson,~ and Samuel I. Miller\*. *179*.

Armstrong, B.Y.J.A., and Hart, A.P.D.A. (1971). Response of cultured macrophages to mycobac- terium tuberculosis , w i t h observations on fusion of lysosomes w i t h phagosomes ( From the National Institute for Medical Research , London , NW7 , England ) its growth within these cells is relatively slo. *134*.

Aung, H., Sherman, J., Tary-lehman, M., and Toossi, Z. (2002). Analysis of transforming growth factor-beta 1 TGF- $\beta$  1 / expression in human monocytes infected with Mycobacterium avium at a single cell level by ELISPOT assay. *25–32*.

Baena, A., and Porcelli, S.A. (2009). Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: REVIEW ARTICLE. *Tissue Antigens 74*, 189–204.

Behar, S.M., Divangahi, M., and Remold, H.G. (2010). Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? (NIH public access manuscript). *Nat. Rev. Microbiol. 8*, 668–674.

Bhatt, K., and Salgame, P. (2007). Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Immunol. 27*, 347–362.

Biology C, Huang L, Chang H, et al. The International Journal of Biochemistry Klf10 deficiency in mice exacerbates pulmonary inflammation by increasing expression of the proinflammatory molecule NPRA. *Int J Biochem Cell Biol. 2016;79:231–238*.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., and Nathan, C. (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med. 174*, 1549–1555.

Bongiovanni, B., Mata-Espinosa, D., D’Attilio, L., Leon-Contreras, J.C., Marquez-Velasco, R., Bottasso, O., Hernandez-Pando, R., and Bay, M.L. (2015). Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis 95*, 562–569.

BoseDasgupta, S., and Pieters, J. (2014). Inflammatory Stimuli Reprogram Macrophage Phagocytosis to Macropinocytosis for the Rapid Elimination of Pathogens. *PLoS Pathog. 10*.

Cao, Z., Wara, A.K., Idi, B., Sun, X., Packard, R.R.S., Esen, F., Stapleton, C.J., Subramaniam, M., Kretschmer, K., Apostolou, I., et al. (2009a). Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor- $\beta$ 1 to regulate CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells and T regulatory cells. *J. Biol. Chem. 284*, 24914–24924.

Cao, Z.X., Wara, a K., Icli, B., Sun, X.H., Packard, R.R.S., Esen, F., Stapleton, C.J., Subramaniam, M., Kretschmer, K., Apostolou, I., et al. (2009b). Kruppel-like Factor KLF10 Targets Transforming Growth Factor-beta 1 to Regulate CD4(+)CD25(-) T Cells and T

Regulatory Cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 24914–24924.

Dannenberg, A.M., and Rook, G.A.W. (1994). Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis : an Interplay of Tissue-Damaging and Macrophage- Activating Immune Responses — Dual Mechanisms That Control Bacillary Multiplication. 459–483.

David, C. (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S345.

David, S., and Caetano, R. e S. (2015). Signaling by Myeloid C.type Lectin receptors in immunity and homeostasis. 491–529.

Donovan, M.L., Schultz, T.E., Duke, T.J., and Blumenthal, A. (2017). Type I interferons in the pathogenesis of tuberculosis: Molecular drivers and immunological consequences. *Front. Immunol.* *8*.

Fine, P.E.M. (1998). Vaccines, genes and trials. *Novartis Found. Symp.* 57–72.

Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., and Falkow, S. (1993). Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* *364*, 639–642.

Fueki, N., Sagara, H., Akimoto, K., Ota, M., Okada, T., Sugiyama, K., Fueki, M., Makino, S., and Fukuda, T. (2007). Interleukin-10 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling in cultured human bronchial epithelial cells. *Respiration* *74*, 454–459.

Gengenbacher, M., and Kaufmann, S.H.E. (2012). Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 514–532.

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.

Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* *44*, 463–475.

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.

Huang, L.T., Chang, H.W., Wu, M.J., Lai, Y.T., Wu, W.C., Yu, W.C.Y., and Chang, V.H.S. (2016). Klf10 deficiency in mice exacerbates pulmonary inflammation by increasing expression of the proinflammatory molecule NPRA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *79*, 231–238.

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

Jaques, V. snick (1990). Van Snick, Jacques. Interleukin-6- An Overview. *Annu. Rev. Immunol.* *8*, 253–278.

- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., and Pieters, J. (2007). Survival of Mycobacteria in Macrophages Is Mediated by Coronin 1-Dependent Activation of Calcineurin. *Cell* 130, 37–50.
- Jeremiah, C., Petersen, E., Nantanda, R., Mungai, B.N., Migliori, G.B., Amanullah, F., Lungu, P., Ntoumi, F., Kumarasamy, N., Maeurer, M., et al. (2022). The WHO Global Tuberculosis 2021 Report – not so good news and turning the tide back to End TB. *Int. J. Infect. Dis.* 5–8.
- Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining Macropinocytosis. 364–371.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2009). Separation and detection of large phosphoproteins using phos-tag sds-page. *Nat. Protoc.* 4, 1513–1521.
- Ladel, C.H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K., Kopf, M., and Kaufmann, S.H.E. (1997). Lethal Tuberculosis in Interleukin-6-Deficient Mutant Mice. *65*, 4843–4849.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2010). Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 8, 44–54.
- Lavalett, L., Rodriguez, H., Ortega, H., Sadee, W., Schlesinger, L.S., and Barrera, L.F. (2017). Alveolar macrophages from tuberculosis patients display an altered inflammatory gene expression profile. *Tuberculosis* 107, 156–167.
- Liu, P.T., and Modlin, R.L. (2008). Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 371–376.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Looney, M., Lorenc, R., Halushka, M.K., and Karakousis, P.C. (2021). Key Macrophage Responses to Infection With Mycobacterium tuberculosis Are Co-Regulated by microRNAs and DNA Methylation. *Front. Immunol.* 12, 1–14.
- López-Agudelo, V.A., Baena, A., Barrera, V., Cabarcas, F., Alzate, J.F., Beste, D.J.V., Ríos-Estapa, R., and Barrera, L.F. (2022). Dual RNA Sequencing of Mycobacterium tuberculosis-Infected Human Splenic Macrophages Reveals a Strain-Dependent Host–Pathogen Response to Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 23.
- Lugo-Villarino, G., Troegeler, A., Balboa, L., Lastrucci, C., Duval, C., Mercier, I., Bénard, A., Capilla, F., Al Saati, T., Poincloux, R., et al. (2018). The C-type lectin receptor DC-SIGN has an anti-inflammatory role in Human M(IL-4) macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.* 9, 1–15.
- Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32:23–63.
- Maher, D., and Nunn, P. (1998). Commentary: Making tuberculosis treatment available for all. *Bull. World Health Organ.* 76, 125–126.
- Mata-Espinosa, D.A., Mendoza-Rodríguez, V., Aguilar-León, D., Rosales, R., López-Casillas, F., and Hernández-Pando, R. (2008). Therapeutic effect of recombinant adenovirus

encoding interferon- $\gamma$  in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol. Ther.* *16*, 1065–1072.

Martínez-Armenta M, León-guerrero SD De, Catalán A, et al. Molecular and Cellular Endocrinology TGF $\beta$ 2 regulates hypothalamic Trh expression through the TGF $\beta$  inducible early gene-1 ( TIEG1 ) during fetal development. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;400:129–139.

Mehra, S., Foreman, T.W., Didier, P.J., Ahsan, M.H., Hudock, T.A., Kisse, R., Golden, N.A., Gautam, U.S., Johnson, A.M., Alvarez, X., et al. (2015). The DosR Regulon Modulates Adaptive Immunity and Is Essential for Mycobacterium tuberculosis Persistence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *191*, 1185–1196.

Othieno, C., Hirsch, C.S., Hamilton, B.D., Wilkinson, K., Ellner, J.J., and Toossi, Z. (1999). Interaction of Mycobacterium tuberculosis -Induced Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Interleukin-10. *67*, 5730–5735.

Papadakis, K.A., Krempski, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmiento, O.F., Lomber, G.A., Urrutia, R.A., Faubion, W.A., Ga, L., Ra, U., et al. (2015a). Krüppel-like factor KLF10 deficiency predisposes to colitis through colonic macrophage dysregulation. 900–909.

Papadakis, K.A., Krempski, J., Reiter, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmiento, O.F., Huseby, A., Johnson, A.J., Lomber, G.A., Urrutia, R.A., et al. (2015b). Krüppel-like factor KLF10 regulates transforming growth factor receptor II expression and TGF-  $\beta$  signaling in CD8  $\alpha$  T lymphocytes. *1*, 362–371.

Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M.E., Morales, C., Charli, J.L., and Joseph-Bravo, P. (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* *68*, 345–354.

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.

Pieters, J. (2008). Review Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage : Maintaining a Balance. 399–407.

Pisu, D., Huang, L., Narang, V., Theriault, M., Lê-Bury, G., Lee, B., Lakudzala, A.E., Mzinza, D.T., Mhango, D. V., Mitini-Nkhoma, S.C., et al. (2021). Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *J. Exp. Med.* *218*.

Plumlee, C.R., Duffy, F.J., Gern, B.H., Delahaye, J.L., Cohen, S.B., Stoltzfus, C.R., Rustad, T.R., Hansen, S.G., Axthelm, M.K., Picker, L.J., et al. (2021). Ultra-low Dose Aerosol Infection of Mice with Mycobacterium tuberculosis More Closely Models Human Tuberculosis. *Cell Host Microbe* *29*, 68-82.e5.

Redford, P.S., Murray, P.J., and O’Garra, A. (2011). The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunol.* *4*, 261–270.

Rosales-Reyes, R., Pérez-López, A., Sánchez-Gómez, C., Hernández-Mote, R.R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., and Alpuche-Aranda, C.M. (2012). Salmonella infects B



cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microb. Pathog.* 52, 367–374.

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

Sánchez-Pérez, J.H. (2021). Tuberculosis in Mexico in times of COVID-19: some reflections.

Sasindran, S.J., and Torrelles, J.B. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation : what is beneficial for the host and for the bacterium ? 2, 1–16.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 878–888.

Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, et al. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990;144:2771–80.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:463–496.

Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012). *Mycobacteria* and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)! *Traffic* 13, 1042–1052.

Srinivasan, L., Ahlbrand, S., and Briken, V. (2014). Interaction of *mycobacterium tuberculosis* with host cell death pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, 1–15.

Subramaniam, M., Harris, S.A., Oursier, M.J., Rasmussen, K., Riggs, B.L., and Spelsberg, T.C. (1995). Identification of a novel TGF- $\beta$ 3-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. 23, 4907–4912.

Subramaniam, M., Gorny, G., Johnsen, S.A., Monroe, D.G., Evans, G.L., Fraser, D.G., Rickard, D.J., Rasmussen, K., van Deursen, J.M.A., Turner, R.T., et al. (2005). TIEG1 Null Mouse-Derived Osteoblasts Are Defective in Mineralization and in Support of Osteoclast Differentiation In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1191–1199.

Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. 9, 639–649.

Swanson, J.A., and King, J.S. (2019). The breadth of macropinocytosis research. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374.

Tăbăran, A.F., Matea, C.T., Mocan, T., Tăbăran, A., Mihaiu, M., Iancu, C., and Mocan, L. (2020). Silver nanoparticles for the therapy of tuberculosis. *Int. J. Nanomedicine* 15, 2231–2258.

Tebruegge, M., Dutta, B., Donath, S., Ritz, N., Forbes, B., Camacho-Badilla, K., Clifford, V., Zufferey, C., Robins-Browne, R., Hanekom, W., et al. (2015). Mycobacteria-specific cytokine responses detect tuberculosis infection and distinguish latent from active tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *192*, 485–499.

Torres Tejerizo, G., Bañuelos, L.A., Cervantes, L., Gaytán, P., Pistorio, M., Romero, D., and Brom, S. (2015). Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J. Microbiol. Methods* *117*, 155–163.

Villaseñor, T., Madrid-Paulino, E., Maldonado-Bravo, R., Pérez-Martínez, L., and Pedraza-Alva, G. (2019). Mycobacterium bovis BCG promotes IL-10 expression by establishing a SYK/PKC $\alpha/\beta$  positive autoregulatory loop that sustains STAT3 activation. *Pathog. Dis.* *77*, 1–11.

WHO 2021 Global tuberculosis Report.

Wynn, T. a., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* *496*, 445–455.

Yew, W.W. (1999). Directly observed therapy, short-course: The best way to prevent multidrug-resistant tuberculosis. *Chemotherapy* *45*, 26–33.

Yoshida, S., Gaeta, I., Pacitto, R., Krienke, L., Alge, O., Gregorka, B., and Swanson, J.A. (2015). Differential signaling during macropinocytosis in response to M-CSF and PMA in macrophages. *Front. Physiol.* *6*, 1–9.

Zhang, G., Deweerdt, N.A., Stifter, S.A., Liu, L., Zhou, B., Wang, W., Zhou, Y., Ying, B., Hu, X., Matthews, A.Y., et al. (2018). A proline deletion in IFNAR1 impairs IFN-signaling and underlies increased resistance to tuberculosis in humans. *Nat. Commun.* *9*, 1–9.

Zhang, M., Lin, Y., Iyer, D. V., Gong, J., Abrams, J.S., and Barnes, P.F. (1995). T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* *63*, 3231–3234.

Zhang, W., Wang, X., Xia, X., Liu, X., Suo, S., Guo, J., Li, M., Cao, W., Cai, Z., Hui, Z., et al. (2013). Klf10 inhibits IL-12p40 production in macrophage colony-stimulating factor-induced mouse bone marrow-derived macrophages. *Eur. J. Immunol.* *43*, 258–269.



## ARTICLE

# Klf10 favors *Mycobacterium tuberculosis* survival by impairing IFN- $\gamma$ production and preventing macrophages reprogramming to macropinocytosis

Edgardo Madrid-Paulino<sup>1</sup> | Dulce Mata-Espinosa<sup>2</sup> | Juan Carlos León-Contreras<sup>2</sup> |  
 Isela Serrano-Fujarte<sup>3</sup> | Sol Díaz de León-Guerrero<sup>1</sup> | Tomás Villaseñor<sup>1</sup> |  
 Lucero Ramon-Luing<sup>4</sup> | José L. Puente<sup>3</sup> | Leslie Chavez-Galan<sup>4</sup> |  
 Rogelio Hernández-Pando<sup>2</sup> | Leonor Pérez-Martínez<sup>1</sup> | Gustavo Pedraza-Alva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>4</sup>Laboratory of Integrative Immunology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

## Correspondence

Gustavo Pedraza-Alva, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.  
 Email: [gustavo.pedraza@ibt.unam.mx](mailto:gustavo.pedraza@ibt.unam.mx)

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**Summary sentence:** By inducing *Klf10* expression, *Mycobacterium tuberculosis* decreases IFN- $\gamma$  production and impairs an IFN- $\gamma$ -mediated autocrine loop that promotes macrophage macropinocytosis, thus favoring survival and infection.

## Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* has developed diverse mechanisms to survive inside phagocytic cells, such as macrophages. Phagocytosis is a key process in eliminating invading pathogens; thus, *M. tuberculosis* efficiently disrupts phagosome maturation to ensure infection. However, inflammatory cytokines produced by macrophages in response to early *M. tuberculosis* infection are key to promoting bacterial clarification. IFN- $\gamma$  enhances *M. tuberculosis* engulfment and destruction by reprogramming macrophages from phagocytosis to macropinocytosis. Here, we show that the transcription factor Krüppel-like factor 10 (Klf10) plays a positive role in *M. tuberculosis* survival and infection by negatively modulating IFN- $\gamma$  levels. Naïve Klf10-deficient macrophages produce more IFN- $\gamma$  upon stimulation than wild-type macrophages, thus enhancing bacterial uptake and bactericidal activity achieved by macropinocytosis. Moreover, *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages showed cytoplasmic distribution of coronin 1 correlated with increased pseudopod count and length. In agreement with these observations, *Klf10*<sup>-/-</sup> mice showed improved bacterial clearance from the lungs and increased viability. Altogether, our data indicate that Klf10 plays a critical role in *M. tuberculosis* survival by preventing macrophage reprogramming from phagocytosis to macropinocytosis by negatively regulating IFN- $\gamma$  production upon macrophage infection.

## KEYWORDS

Tuberculosis, Macrophage, Macropinocytosis, Interferon gamma, KLF10

**Abbreviations:** Klf10, Krüppel-like factor 10; MFI, mean fluorescence intensity; TB, tuberculosis; Wt, wild type; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; BMDMs, bone marrow-derived macrophages.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. *Journal of Leukocyte Biology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Society for Leukocyte Biology.

## 1 | INTRODUCTION

*Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB), has caused the most deaths in history.<sup>1</sup> In 2019, the WHO reported that more than 10 million people were infected with TB, causing approximately 1.6 million deaths.<sup>2</sup> TB is transmitted from person to person through inhaling contaminated aerosols. Once inhaled, the bacteria reach the alveolar space of the lungs. In most cases, the immune system can control the bacillus by eliminating it or encapsulating it in granulomas.<sup>3,4</sup> Macrophages are immune cells that play key roles in triggering innate immunity in response to invading pathogens and tissue damage. However, their main functions are to engulf pathogens and dying cells and to cause inflammation.<sup>5</sup> Phagocytosis is an endocytic process, in which macrophages surround solid particles with their plasma membranes and internalize them.<sup>6</sup> This process is highly regulated by different receptors, such as complement receptors, TLRs, scavengers, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin.<sup>7,8</sup> Although phagocytosis is an efficient mechanism for destroying pathogens, *M. tuberculosis* has developed strategies to override it and survive within the macrophage.<sup>9–11</sup> One such mechanism involves coronin 1, which is immediately recruited to *M. tuberculosis*-containing phagosomes. Coronin 1 retention in the phagosome activates calcineurin, a calcium-dependent phosphatase responsible for blocking phagolysosome complex fusion, thus promoting *M. tuberculosis* survival.<sup>4,13</sup> However, when macrophages are activated by inflammatory stimuli, such as TNF or IFN- $\gamma$ , coronin 1 is phosphorylated on serine residues, preventing its recruitment to *M. tuberculosis*-loaded phagosomes. Phosphorylated coronin 1 also induces endocytic reprogramming, switching from phagocytosis to macropinocytosis.<sup>4,14</sup> Macropinocytosis is an effective endocytic mechanism for destroying pathogens, including *M. tuberculosis*. Since it is not limited by receptors, it internalizes a large number of bacteria, and the increased cargo is directly delivered to the lysosomes.<sup>15,16</sup> Although the mechanisms deployed by *M. tuberculosis* to hijack the macrophage machinery to block endocytosis have been widely discussed, how *M. tuberculosis* modulates gene transcription to avoid the expression of genes encoding cytokines involved in macrophage activation, such as TNF and IFN- $\gamma$ , is less understood.

Klf10 is a transcription factor that belongs to the KLF family and was initially identified in human osteoblasts as a TGF- $\beta$  early response gene. Thus, it is also known as the TGF- $\beta$  inducible early gene (TIEG1).<sup>17</sup> Klf10 acts as an activator or repressor that controls gene expression in critical cellular processes such as apoptosis, proliferation, differentiation, neuronal development, and inflammation.<sup>18–20</sup> The colon macrophages from *Klf10*-deficient mice with experimentally induced colitis produced more TNF and IL-6 and less IL-10 in response to LPS than macrophages from wild-type (Wt) mice.<sup>21</sup> Likewise, *Klf10* knock-out (KO) in a mouse model of asthma increases neutrophil migration to the lungs in basal conditions and in response to BSA, as well as *Tnf* mRNA expression in the lung than Wt mice.<sup>22</sup> Although the role of Klf10 has been described in an inflammatory setting, its role in infectious diseases remains unknown. In this study, we showed that

Klf10 plays a critical role in *M. tuberculosis* survival and TB development by preventing macrophages reprogramming from phagocytosis to macropinocytosis through negatively regulating IFN- $\gamma$  production upon infection.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Antibodies

Anti-IFN- $\gamma$  (#513205), FC blocker TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32 # 101320), Alexa Flour 488 anti-CD11b (#101217), and Alexa Flour 700 anti-Ly6c/GR1 (#108418) anti-mouse antibodies were purchased from BioLegend. The anti- $\beta$ -actin (#3700) antibody was purchased from Cell Signaling Technology. Antibody anticoronin-1A (#2291951) was purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Alexa Fluor 647 Goat anti-Mouse IgG (#A21236) was purchased from Invitrogen.

### 2.2 | Reagents

DAPI was purchased from Thermo Fisher Scientific. Colchicine and PMA were purchased from Sigma-Aldrich. Phos-tag™ was from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. The inhibitors Go6983 was purchase from Calbiochem.

### 2.3 | Animals

*Klf10*<sup>-/-</sup> mice in the C57BL/6NJ background were kindly donated by Dr. Subramaniam from the Mayo Clinic Rochester Minnesota.<sup>23</sup> Wt C57BL/6NJ and *Klf10*<sup>-/-</sup> mice were maintained in ventilated racks with food and water ad libitum. All tests were performed during the light cycle using male, 8–10 weeks old, mice. The animal's genotype was corroborated by PCR. All experiments involving mice were approved by the Bioethics committee of the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, (project 384) and by the Bioethics committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (project PAT-1973-19/20-1).

### 2.4 | Cell lines

L929 cells were cultured in DMEM medium (GIBCO) supplemented with 10% FBS (FBS Byproducts), penicillin/streptomycin (100  $\mu$ g/ml) (GIBCO-Invitrogen), and 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich). To generate the L929 conditioned media,  $5 \times 10^5$  cells were plated in a 75 cm<sup>2</sup> flask with 30 ml of supplemented media for 7 days. The culture medium (supernatant) was centrifugated at 213 g for 7 min and filtrated using a 0.22  $\mu$ m filter. Finally, the conditioned media was stored at -20 until used.

The MH-S cell (ATCC) line, derived by SV40 transformation of an adherent cell enriched population of BALB/c mouse alveolar macrophages, was cultured in RPMI medium (GIBCO) supplemented with 10% FBS (Byproducts), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich), and penicillin/streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (GIBCO).

## 2.5 | Bone marrow-derived macrophages

Femurs were obtained from euthanized 8–10 weeks-old Wt C57BL/6 or *Klf10*<sup>-/-</sup> mice. After dissection, muscles were removed from the bone and femurs were placed into a polypropylene tube containing sterile PBS; then placed in 70% ethanol for 1 min, washed in sterile PBS, and both epiphyses were removed. The bones were flushed with a syringe to extrude bone marrow into a 15 ml polypropylene tube; bone marrow cells were then centrifugated at 213 g for 5 min at room temperature, washed, and resuspended into bone marrow differentiation media (supplemented DMEM containing 20% L929 conditioned media as a source of granulocyte/macrophage colony stimulation growth factor).  $5 \times 10^6$  cells were plated in 100 mm low adherent plastic Petri dishes.

Cells were incubated at 37°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>. Forty-eight hours after seeding, 5 ml of the medium was discarded and replaced with 5 ml of fresh medium, this step was repeated each 48 h. On the 7th day, the medium was discarded, the cells were washed with 10 ml of PBS and incubated in 2 ml of cold Versene solution at room temperature for 5 min. Cells were detached by gently pipetting, centrifugated at 213 g for 5 min and resuspended into supplemented RPMI medium. Macrophages were counted and cultured in plates 12 h before the experimental procedure.

## 2.6 | Flow cytometry analysis of bone marrow-derived macrophages

To evaluate cell-surface marker expression,  $1 \times 10^6$  bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were incubated with FC blocker TruStain FcX™ (1  $\mu\text{g}$ ) antibody for 15 min on ice. Then cells were costained with anti-CD11b (1:2000) and anti-Ly6c/GR1(1:1000), washed with FACS juice, and fixed with 2% paraformaldehyde. To determine nonspecific signals, isotype controls were used at the same concentration as the specific antibodies. Analysis was performed using a FACSCanto flow cytometer (BD Bioscience) and FLOWJO software.

## 2.7 | Bacterial cultures

*Escherichia coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium for 16 h at 37°C with shaking prior to the experiment. CFUs were determined by plating bacterial serial dilutions on LB agar with antibiotic for 16 h at 37°C.

*M. tuberculosis* H37Rv (virulent) and H37Ra (nonvirulent) strains were cultured in Middlebrook 7H9 medium enriched with OADC (oleic

acid, albumin, dextrose, and catalase). After culture, mycobacteria were harvested and adjusted to  $2.5 \times 10^5$  cells in 100  $\mu\text{l}$  PBS for in vivo experiments. For in vitro experiments, bacterial cultures were aliquoted and maintained at  $-70^\circ$  until use.

All the procedures for the generation and use of mycobacteria were carried out in a laminar flow cabinet with biosafety level III in the BSL3 facilities of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán experimental pathology laboratory.

The *Salmonella enterica* *S. typhimurium* strains used in this study were ST4/74 and SL1344. Bacteria were grown 18 h at 37°C without shaking in LB medium (1% tryptone, 1% NaCl, and 0.5% yeast extract). The inoculum came from a colony taken from a streptomycin agar plate.

## 2.8 | Phagocytosis and killing assays

BMDMs ( $2 \times 10^5$ /well) were cultured in supplemented DMEM and 16 h later were infected with *E. coli* expressing a red fluorescent protein.<sup>24</sup> Macrophages were infected for 30 min at 37°C at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1. Subsequently, the cells were washed with PBS containing penicillin/streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and fixed with 4% PFA. The actin cytoskeleton was then stained with Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin in PBS-0.1% triton at a 1:500 dilution. For nuclear staining, DAPI was used in PBS-triton at 0.01% at a dilution of 1:5000. Finally, the macrophages were observed using an Olympus IX81 confocal microscope and counted by taking 10 random fields per sample.

For the killing assays,  $1.5 \times 10^5$  BMDMs were cultured in supplemented DMEM and infected 16 h later with *E. coli* using a MOI of 10:1 for 1 hour to evaluate the phagocytic capacity, or for 3.5 hours to evaluate the destructive capacity of the macrophages. After the indicated times, the macrophages were washed with PBS containing penicillin/streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); then PBS with 0.01% triton was added to the cells and placed on ice for 15 min to allow macrophages lysis. Subsequently, 100  $\mu\text{l}$  of the supernatant was taken to prepare serial dilutions, then 10  $\mu\text{l}$  of the dilution was plated on LB containing spectinomycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The plates were incubated at 37°C for 24 h and CFUs were counted.

For the *S. typhimurium* killing assay,  $2 \times 10^5$  BMDMs were plated and infected with *S. typhimurium* (MOI 10:1) for 20 min. Noninternalized bacteria were eliminated by washing 3 times with PBS and then adding fresh medium containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of gentamicin. In order evaluate invasion, cells were further cultured for 2 h, and to evaluate replication cells were cultured for 16 h in DMEM with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin. Cells were then washed and lysed for 5 min with 0.1% SDS/1% Triton X-100/PBS (pH 7.4) (Bio-Rad). CFUs of viable intracellular bacteria were determined by seeding 10  $\mu\text{l}$  of serial dilutions on LB agar without antibiotics.

To evaluate the phagocytosis and destruction of *M. tuberculosis*,  $1.5 \times 10^5$  BMDMs were cultured and subsequently infected with *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) or H37Rv (MOI 5:1) for 1 h or 24 h, respectively. Cells were then washed with PBS containing penicillin/streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and lysed in 100  $\mu\text{l}$  of 0.1% SDS and

100  $\mu$ l of 20% BSA. Subsequently, serial dilutions were prepared and 10  $\mu$ l of each dilution were plated on Middlebrook 7H10 medium, incubated in the dark for 21 days at 37° C with 5% CO<sub>2</sub>; then CFUs were counted.

## 2.9 | Bactericidal capacity calculus

The killing ratio was calculated by dividing the number of phagocytosed bacteria by the number of living bacteria at the end of the infection. Then the killing ratio of Wt macrophages without stimulation was averaged and normalized to 1. The bactericidal capacity was calculated by dividing the kill ratio of Wt macrophages and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages by the normalized average with and without infection.

## 2.10 | Supernatant exchange

Wt or *Klf10*-deficient BMDMs (1.5 × 10<sup>5</sup>) were cultured for 24 h, subsequently, the supernatants were taken, and the cells were discarded. Then the *Klf10* BMDMs supernatant was used to culture Wt BMDMs and the Wt BMDMs supernatant used to culture *Klf10* BMDMs; then 24 h later cells were infected with *E. coli* (MOI 10:1) for 1 h or *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) for 1 h. Phagocytosis and killing assays were performed as described above.

## 2.11 | Interferon blocking

Wt or *Klf10*-deficient BMDMs (1.5 × 10<sup>5</sup>) were treated with anti-IFN- $\gamma$  (500 ng/ml) 16 h before the infection. BMDMs were washed with PBS and fresh medium was added. Subsequently, BMDMs were infected with *E. coli* (MOI 10:1) or *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) for 1 h. Phagocytosis and killing assays were performed as described above.

## 2.12 | Macropinocytosis inhibition

Wt or *Klf10*-deficient BMDMs (1.5 × 10<sup>5</sup>) were treated with colchicine (100  $\mu$ g/ml) for 30 min; then washed with PBS. Fresh medium was added and BMDMs were infected with *E. coli* (MOI 10:1) or *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) for 30 min. Phagocytosis and killing assays were performed as described above.

## 2.13 | ELISA

For TNF and IFN- $\gamma$  ELISA tests, 4 × 10<sup>5</sup> BMDMs were nontreated or exposed to LPS (100 ng/ml), to *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1), or to *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) for 1 h. Subsequently, BMDMs were washed with PBS containing penicillin/streptomycin (100  $\mu$ g/ml). After adding fresh medium, cells were cultured for another 24 h. Supernatants were recovered and TNF and IFN- $\gamma$  levels were analyzed using ELISA Kits from BioLegend (Max Deluxe #430804). LPS was purchased from Sigma-Aldrich.

## 2.14 | Transmission electron microscopy

BMDMs (2.5 × 10<sup>6</sup>) without stimuli or infected with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) were fixed with glutaraldehyde 15% at the indicated time points. Postfixing was made using osmium tetroxide 1%. Samples were dehydrated in graded ethyl alcohols and embedded in low viscosity resin. 1  $\mu$ m sections were prepared, then ultrathin sections of 90 nm were obtained with a Sorval MT-6000 ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate as previously described<sup>25</sup> and examined with a FEI Tecnai TWIN Transmission Electron Microscope.

## 2.15 | Coronin 1 fluorescent analysis

BMDMs (5 × 10<sup>4</sup>) were plated in Lab-Tek® Chamber Slide™ (Merk). Four hours after, the medium was removed and fresh medium added, then BMDMs were treated with PMA (50 ng/ml) with anti-IFN- $\gamma$  (500 ng/ml) blocking antibody for 16 h. Media was then removed and BMDMs were washed extensively with PBS and fixed in 4% PFA (Sigma-Aldrich) for 30 min at RT. Cells were permeabilized with PBS containing 0.1% Triton TX-100 for 30 min at room temperature. F-actin was visualized by incubating cells for 1 h with Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin (1:500). Cell nuclei were labeled with DAPI (1:5000) for 15 min. Coronin 1 was visualized incubating with anti-coronin 1A Ab (1:200) for 4 h and with a secondary mouse antibody Alexa Fluor A647 (1:400) for 1 h. BMDMs were imaged using Confocal Olympus FV1000 Inverted microscope.

## 2.16 | Protein extracts and immunoblotting

BMDMs were lysed in 100  $\mu$ l of lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate pH 7.4, 2 mM PPIa, 2 mM EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol), supplemented with complete protease inhibitor (Roche) and phosphatase inhibitors (200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF) for 15 min at 4°C. Lysates were centrifuged at 19318 g for 10 min at 4°C, and the supernatants were recovered and stored at -70°C until use. To visualize coronin 1 phosphorylation on SDS-PAGE, 50  $\mu$ M Phos-tag and 50  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> were added to the acrylamide solution. After that, protein separation and immunoblot were performed as previously described<sup>26</sup> using anticoronin-1A and anti- $\beta$ -actin antibodies. Antibody-antigen interactions were visualized by chemiluminescence using a LI-COR Biosciences instrument.

## 2.17 | Mouse infection

Male C57BL/6NJ Wt and C57BL/6NJ *Klf10*<sup>-/-</sup> 11 or 12 weeks-old mice were used for the infection experiments. The animals were anesthetized with sevoflurane steam (100  $\mu$ l per mouse) for intratracheal infection as previously described.<sup>27</sup> Briefly, the animals were placed on an aluminum-coated unicell plate, and the incisors were held with a rubber band, a 22G x 1.0 blunt tip canula was inserted 1.25 mm through



the trachea, and they were infected with 250,000 CFUs each of the *M. tuberculosis* H37Rv strain, suspended in saline (SS). Animals were sacrificed at the indicated time points after infection the lungs were dissected and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. The animals infected with mycobacteria were housed and handled under animal biosafety level 3 protocols.

## 2.18 | Patients and sample processing

Five >18-year-old patients with active pulmonary TB from a cohort recruited across 2018 at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico (protocol code B07-18), and 5 healthy donors were included in this study. All participants provided written informed consent to use their blood samples and clinical data for research. Patients were diagnosed with drug-susceptible TB at diagnosis time, and patients with HIV infection, malignant diseases, chronic renal failure, and liver cirrhosis were excluded.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells was performed with 6 ml of whole blood collected into BD Vacutainer® EDTA tubes by standard Lymphoprep™ (Accurate Chemical-Scientific, Westbury, NY, USA) density gradient centrifugation. Then,  $2 \times 10^6$  PBMCs were suspended in DNA/RNA Shield solution (Zymo Research, Irvine, CA, USA) in a proportion of 1 to 3 volumes of sample to the solution, mixed, and incubated at room temperature to allow cell lysis, preserving RNA stability. Cell lysates were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used for RNA extraction.

## 2.19 | Determination of the lung bacterial load

Lungs were thawed and 500  $\mu\text{l}$  of PBS-0.05% tween were added. The tissue was homogenized with the FastPrep24 system, and the mixture was brought to a final volume of 1 ml with PBS-0.05% Tween. Four dilutions of each homogenate were spread onto duplicate plates containing Bacto Middlebrook 7H10 agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) enriched with OADC. Bacterial colonies were counted 21 days after seeding.

## 2.20 | RNA extraction and qPCR

Total RNA was isolated from  $2.5 \times 10^5$  MHS mouse alveolar macrophages infected with *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) or *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) for 2 h, using the guanidine thiocyanate extraction method as previously described.<sup>28</sup> Final RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm in a spectrophotometer. From human mononuclear cells total RNA was purified from cell lysates previously unfrozen at room temperature with the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA contamination was eliminated using an RNA-Free DNase Set (Qiagen), and RNA concentration was quantified using the

Qubit™ assay kit and the Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Waltham, USA).

Reverse transcription was performed using 1  $\mu\text{g}$  of RNA from the MH-S mouse macrophages or 200 ng of RNA from patient peripheral mononuclear cells, oligo dT, and the M-MLV Reverse Transcriptase (28025013; Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions.

Real-time PCR was performed using the TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (4444963; Applied Biosystems) or the Luminaris Probe High Rox qPCR Master Mix (K0933; Thermo Fisher Scientific) using the following Taqman® Gene expression Assays (Applied Biosystems): *Klf10* (Mm00449812\_m1, Hs00921811\_m1), *Irfng* (Hs00989291\_m1), *Ndufa10* (Ubc, Mm01240336\_1), and *Gapdh* (Hs02758991\_g1). Transcript levels were determined using a Step One sequence detection system (Applied Biosystems). The relative expression levels were calculated by normalizing against *Ubc* or *Gapdh* using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method.<sup>29</sup>

## 2.21 | Statistical analysis

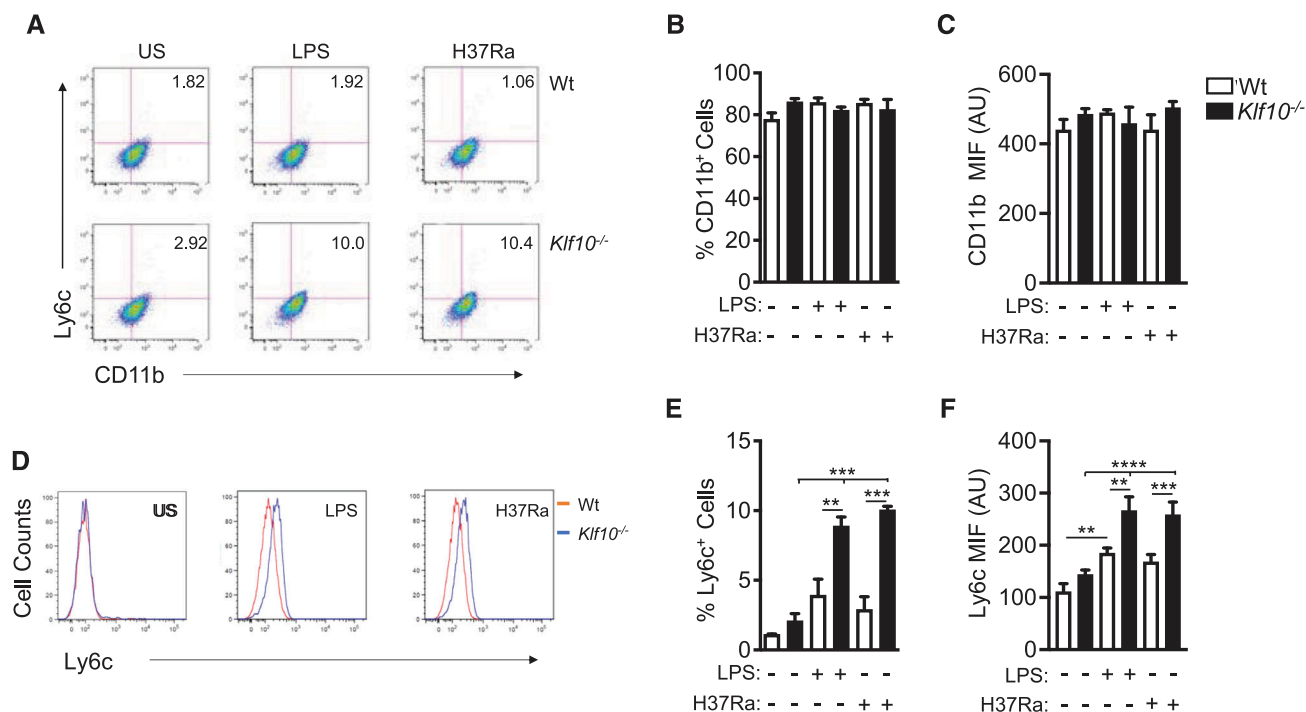
Data are presented as the mean  $\pm$  SD. Unpaired *t*-test, one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's test was applied to the data to evaluate statistical significance for multiple comparisons, using the GraphPad Prism 8 statistical software. Significance value was defined as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## 3 | RESULTS

### 3.1 | *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages show an activated phenotype in vitro

To confirm no defects in *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophage differentiation, we isolated *Klf10*<sup>-/-</sup> and Wt mice bone marrow cells and differentiated them *in vitro*. *Klf10* deficiency did not affect the differentiation of bone marrow cells into naïve macrophages, as flow cytometry suggests that 80% differentiated cells were CD11b<sup>+</sup>, with no statistical differences between Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> cells (Figures 1(A)–1(C)). Likewise, the percentage of unstimulated Ly6c-expressing (Ly6c<sup>+</sup>) CD11b<sup>+</sup> macrophages was similar in Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> mice (Figures 1(D) and 1(E)). Additionally, CD11b (Figure 1(C)) and Ly6c (Figure 1(F)) levels on unstimulated Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophage surfaces were not statistically different. However, as previously observed in macrophages obtained from mice with colitis,<sup>21</sup> activated macrophages (Ly6c<sup>+</sup>) from *Klf10*<sup>-/-</sup> mice were almost twice of those from Wt mice upon LPS stimulation or *M. tuberculosis* H37Ra infection (Figure 1(E)). Consistently, we found that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages expressed approximately 20% more Ly6c on the cell surface in response to *M. tuberculosis* H37Ra or LPS than Wt macrophages, determined using the mean fluorescence intensity (MFI) (Figure 1(F)). These results show that macrophages from *Klf10*<sup>-/-</sup> mice were more activated than those from Wt mice in response to stimuli such as *M. tuberculosis* or LPS.





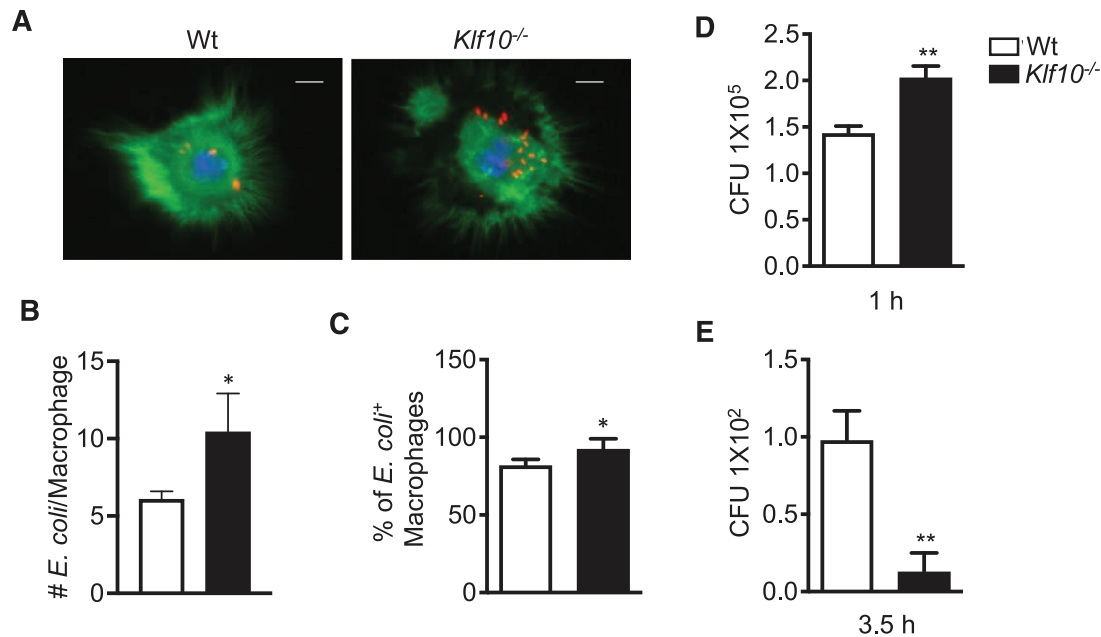
**FIGURE 1** Ly6c expression is up-regulated in *Klf10*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived macrophages. Wild-type (Wt) or *Klf10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were differentiated as described in section *Material and Methods*.  $4 \times 10^5$  cells were left unstimulated (US), stimulated with LPS (100 ng/ml) or infected with *M. tuberculosis* Ra (MOI 10:1) for 1 h. Cells were collected and stained with the indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. (A) Representative dot plot, (B) % CD11b<sup>+</sup> cells percentage, (C) CD11b cellular levels, mean fluorescence intensity (MFI), (D) representative Ly6c histogram plot, (E) Ly6c<sup>+</sup> cells percentage, (F) Ly6c cellular levels, mean fluorescence intensity (MFI). Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  were determined by two-way ANOVA follow by a Tukey's multiple comparisons test. AU, arbitrary units

### 3.2 | *Klf10* KO increases the phagocytic and destructive capacity of macrophages

Since *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophage activation was enhanced upon stimulation, we wondered whether these macrophages were more efficient at phagocytosing bacteria. Therefore, as a first approach to answer this question, *Klf10*<sup>-/-</sup> and Wt macrophages were infected with *E. coli* DH5<sup>mCherry</sup> for 1 h. Interestingly, *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages phagocytosed 1.5 times more bacteria than Wt macrophages (Figures 2(A) and 2(B)), and almost all *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages phagocytosed bacteria (Figure 2(C)). In agreement with this, 1 h after macrophage infection, the bacterial count in the *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages was higher than that in the Wt macrophages, corroborating that these macrophages were efficiently internalizing bacteria (Figure 2(D)). However, phagocytic capacity is not necessarily related to killing capacity. To evaluate the efficiency of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages in destroying bacteria, we performed killing assays. Within 3.5 h of infection, *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages destroyed almost all the bacteria compared with Wt macrophages (Figure 2(E)). Together, these results indicate that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages have enhanced phagocytic and destructive capacity.

### 3.3 | *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages are efficient at destroying *M. tuberculosis*

Since *M. tuberculosis* evades its own destruction inside macrophages through various mechanisms, we tested whether *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages destroyed *M. tuberculosis*. Therefore, we infected Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages with the nonvirulent H37Ra or virulent H37Rv *M. tuberculosis* strains for 1 h to measure macrophage phagocytic capacity and 24 h to evaluate macrophage bactericidal activity. Although the phagocytic capacity of Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages against the nonvirulent *M. tuberculosis* H37Ra strain was not significantly different (Figure 3(A)), *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were more efficient in phagocytosing the virulent H37Rv strain (Figure 3(D)). Nonetheless, 24 h after infection, *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages destroyed *M. tuberculosis* H37Ra and H37Rv more efficiently than Wt macrophages (Figures 3(B) and 3(E)). Furthermore, considering the number of phagocytosed bacteria and the remaining live bacteria, *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were at least 4 times more efficient in eliminating virulent H37Rv *M. tuberculosis* than Wt macrophages (Figures 3(C) and 3(F)). Together, these results indicate that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages have enhanced phagocytic and destructive capacities



**FIGURE 2** *Klf10*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived macrophages exhibit enhanced phagocytic and bactericidal activity against *E. coli*.  $2.5 \times 10^5$  wild-type (Wt) or *Klf10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were infected (MOI 10:1) with fluorescent *E. coli*. Cells were then fixed, stained, and analyzed by confocal microscopy (A). Bar represents 3 μm. The number of *E. coli* per macrophage (B) and the number of macrophages that had phagocytosed were determined (C). The number of *E. coli* phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 1 h after infection (D). The number of surviving *E. coli* was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 3.5 h after infection (E). Data represent the mean ± SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  were determined by unpaired *t*-test

against pathogenic gram-negative and gram-positive bacteria, such as *E. coli* and *M. tuberculosis*, respectively.

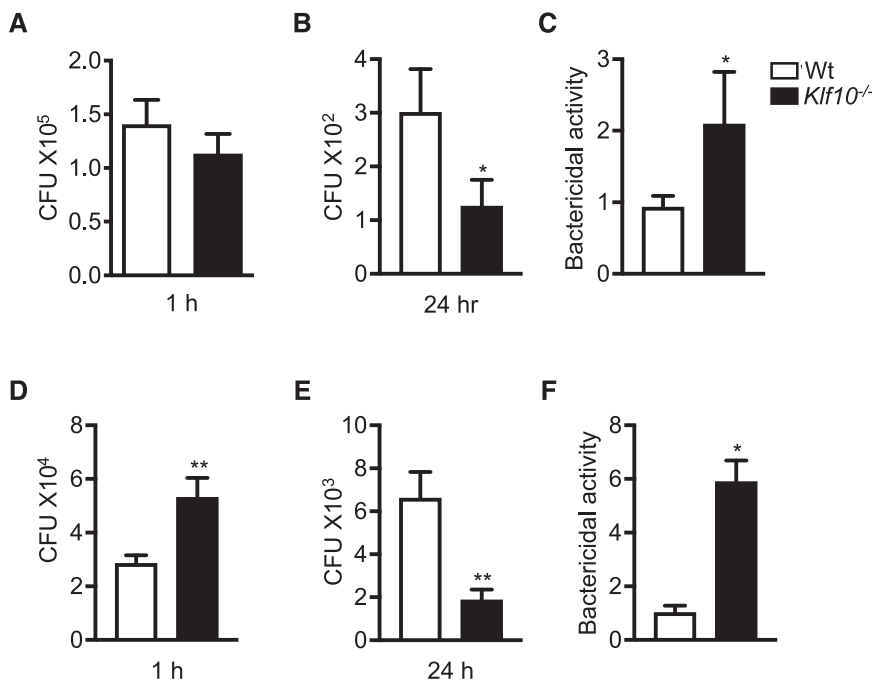
### 3.4 | IFN- $\gamma$ induces the phagocytic and destructive capacity of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages

Since we observed that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were more effective in phagocytosing and destroying bacteria, we evaluated whether this phenomenon was caused by a soluble factor released into the culture media in an autocrine or paracrine manner. We first cultured *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages in conditioned media from Wt macrophages and vice versa; then, we performed phagocytosis and killing assays against *E. coli* or *M. tuberculosis* after 24 h. Culturing *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages in Wt-conditioned media significantly reduced their phagocytic activity (Figure 4(A)) and bactericidal capacity against *E. coli* to that of Wt macrophages (Figures 4(B) and 4(C)). In contrast, culturing Wt macrophages with conditioned media from *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages did not improve their phagocytic activity (Figure 4(A)), but marginally improved their bactericidal activity (Figures 4(B) and 4(C)). Likewise, when *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were cultured in Wt-conditioned media, both their phagocytic (Figure 4(D)) and bactericidal capacity (Figures 4(E) and 4(F)) against *M. tuberculosis* were significantly reduced to levels of Wt macrophages. Again, culturing Wt macrophages with conditioned media from *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages slightly improved their phagocytic (Figure 4(D)) and bactericidal activ-

ity (Figures 4(E) and 4(F)) against *M. tuberculosis*. Together, these results suggest that *Klf10*-deficient macrophages require soluble factors to maintain their enhanced phagocytic and bactericidal activities against gram-negative and gram-positive bacteria.

Since TNF and IFN- $\gamma$  favor macrophage activation, enhancing pathogen capture and destruction by promoting macropinocytosis,<sup>14</sup> we evaluated the presence of these inflammatory cytokines in the culture medium of naïve or stimulated BMDMs. Similar to that reported previously,<sup>21</sup> TNF (Figures 5(A) and 5(C)) and IL-6 (data not shown) levels were not different between naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> and Wt macrophages. However, we observed that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages produced more TNF in response to LPS, nonvirulent *M. tuberculosis* H37Ra and virulent *M. tuberculosis* H37Rv than Wt macrophages (Figures 5(A) and 5(C)). In contrast to TNF, we found that IFN- $\gamma$  secreted by naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages was almost twice as that of naïve Wt macrophages (Figures 5(B) and 5(D)). Furthermore, we observed that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages produced more IFN- $\gamma$  in response to LPS (Figures 5(B) and 5(D)). Unlike *M. tuberculosis* H37Ra infection that marginally promoted IFN- $\gamma$  secretion by *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages (Figure 5(B)), *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages infected with the virulent *M. tuberculosis* H37Rv strain produced higher IFN- $\gamma$  levels than Wt macrophages (Figure 5(D)).

Thus, to confirm that the enhanced phagocytic capacity of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages is mediated by IFN- $\gamma$ , we treated BMDMs with an anti-IFN- $\gamma$  antibody 12 h before *E. coli* or *M. tuberculosis* infection. Interestingly, treating Wt macrophages with the anti-IFN- $\gamma$  antibody



**FIGURE 3** *Klf10*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived macrophages exhibit enhanced phagocytic and bactericidal activity against nonvirulent and virulent *Mycobacterium tuberculosis*.  $1.5 \times 10^5$  wild-type (Wt) or *Klf10*<sup>-/-</sup> BMDMs were infected with *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) (A–C) or with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D–F). The number of *Mycobacterium* phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 1 h after infection (A and D). The number of surviving *Mycobacterium* was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 24 h after infection (B and E). The bactericidal activity was calculated as described under *Materials and Methods* and plotted (C and F). Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  were determined by unpaired *t*-test

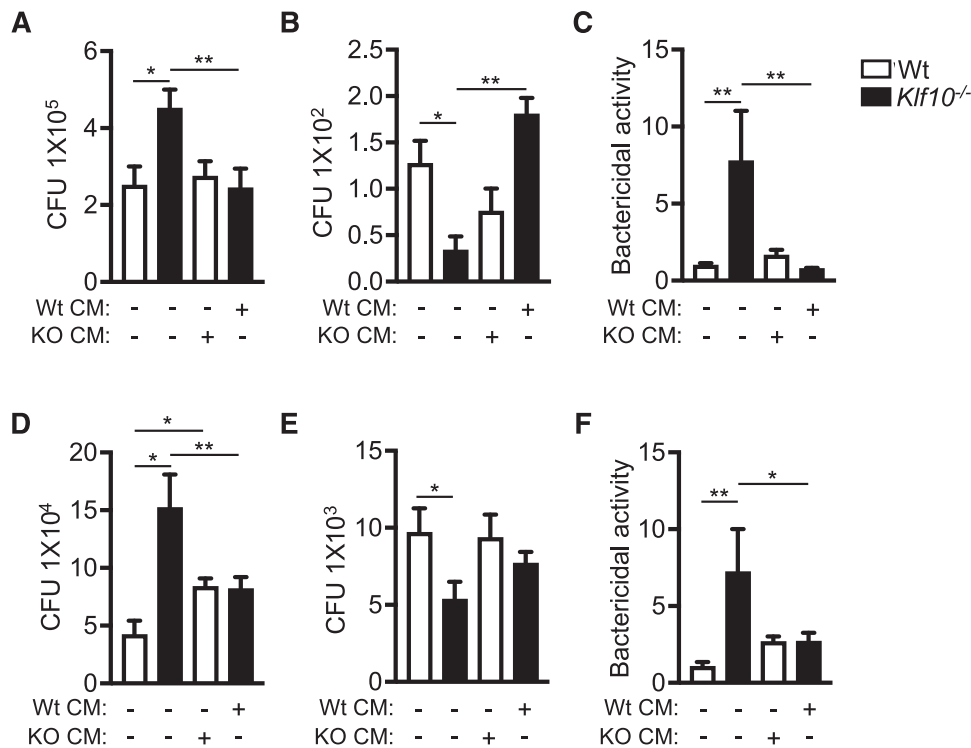
did not affect their phagocytic or destructive capacity toward *E. coli* (Figures 6(A)–6(C)) or *M. tuberculosis* H37Rv (Figures 6(D)–6(F)). In contrast, the phagocytic capability of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages after blocking IFN- $\gamma$  was similar to that of the Wt macrophages when infected with *E. coli* (Figure 6(A)), but did not affect the phagocytic capacity for *M. tuberculosis* (Figure 6(D)). Nonetheless, blocking IFN- $\gamma$  considerably decreased the destructive capacity of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages (Figures 6(C) and 6(F)), almost doubling or quadrupling the number of live *E. coli* (Figure 6(B)) and *M. tuberculosis* (Figure 6(E)), respectively. These results show that the increased phagocytic and destructive capacities of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages are mediated by IFN- $\gamma$ , suggesting that these macrophages may internalize bacteria via macropinocytosis. Support for this idea was generated using *S. typhimurium*, which, unlike *E. coli* or *M. tuberculosis*, invades host cells, including macrophages, by promoting macropinocytosis.<sup>30,31</sup> Accordingly, the number of internalized *S. typhimurium* (Figure 6(G)) or surviving bacteria (Figure 6(H)), were similar between Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages independent of the *Salmonella* strain used.

Together, our data indicate that the enhanced pathogen capture and destruction shown by *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages results from increased IFN- $\gamma$  production reprogramming macrophages toward macropinocytosis.

### 3.5 | *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages are reprogrammed to macropinocytosis

To confirm that the increased antimicrobial effects of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages are caused due to reprogramming to engulf microorganisms by macropinocytosis, we inhibited macropinocytosis by

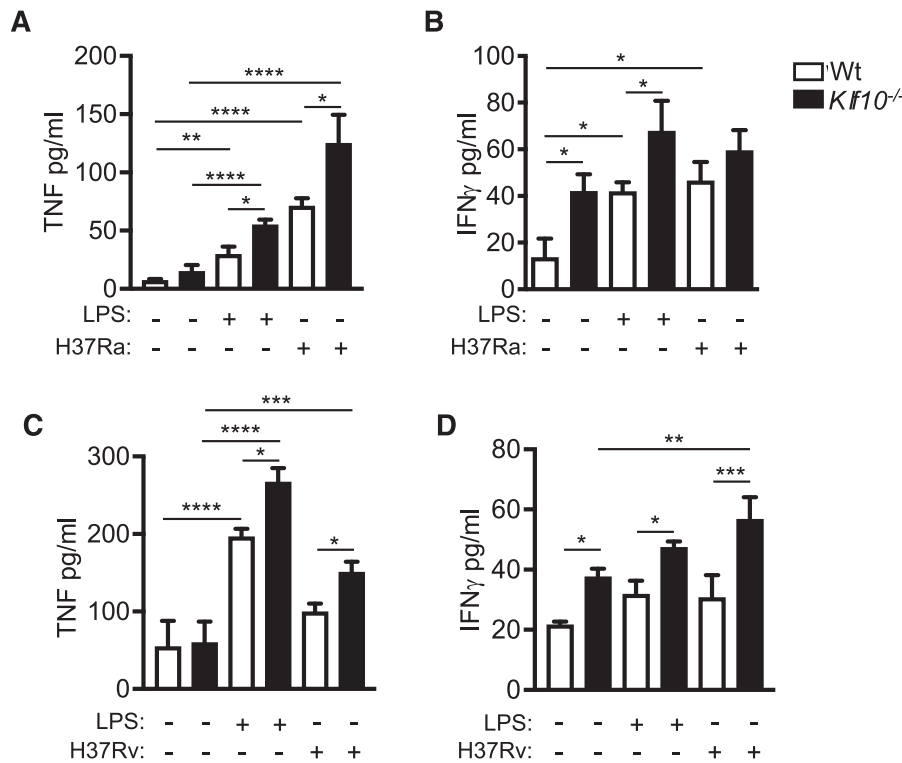
treating the macrophages with colchicine for 30 min prior to infection with *E. coli* or *M. tuberculosis*. Inhibiting macropinocytosis caused a drastic decrease in the ability of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages to engulf bacteria, internalizing approximately 50% less *E. coli* (Figure 7(A)) and approximately 60% less *M. tuberculosis* (Figure 7(D)), while Wt macrophages were unaffected by colchicine treatment (Figures 7(A) and 7(D)). Measuring the destructive capacity, we found that colchicine-treated *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were inefficient in destroying *E. coli* than untreated macrophages or untreated or colchicine-treated Wt macrophages (Figures 7(B) and 7(C)). Although the number of *M. tuberculosis* that survived in colchicine-treated *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages was similar to that found in *Klf10*<sup>-/-</sup> untreated macrophages (Figure 7(E)), the number of mycobacteria initially internalized and that of the remaining bacteria after 24 h indicated that colchicine impaired the ability of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages to destroy *M. tuberculosis* (Figure 7(F)). Considering that: (i) coronin 1 recruitment to phagosomes during *M. tuberculosis* internalization by naïve macrophages impairs phagosome maturation, thus favoring *M. tuberculosis* survival and proliferation<sup>12</sup>; (ii) IFN- $\gamma$  promotes coronin 1 translocation from the cell membrane to the cytosol through a protein kinase C (PKC)-dependent mechanism, reprogramming macrophages from phagocytosis to macropinocytosis<sup>14</sup> improving macrophages pathogen destruction capacities; and (iii) naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages produce IFN- $\gamma$  (Figures 5(B) and 5(D)), we evaluated coronin 1 cellular localization. Naïve Wt macrophages showed a coronin 1 homogeneous distribution around the cell colocalizing with subcortical actin (Figure 7(G), top left panels), whereas *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages showed large membrane areas devoid of coronin 1, which was colocalized with actin in the pseudopods (Figure 7(G), lower left panels). As previously reported,<sup>29</sup> PMA exposure translocated coronin 1 from the cell membrane to the



**FIGURE 4** A secreted factor promotes the enhanced phagocytic and bactericidal activities of the *Klf10*-deficient macrophages. Wild-type (Wt) and *KLF10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were cultured for 24 h. Afterward, the culture medium was collected, cells were washed extensively with PBS. Then, Wt BMDMs were cultured in conditioned media (CM) from *Klf10*<sup>-/-</sup> BMDMs (KO) while *Klf10*<sup>-/-</sup> BMDMs were cultured with conditioned media from Wt BMDMs for 24 h. Cells were then infected with *E. coli* (MOI 10:1) (A–C) or with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D–F). For the *E. coli* infection, the number of *E. coli* phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 1 h after infection (A), the number of surviving *E. coli* was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 3.5 h after infection (B), and the bactericidal activity was calculated (C). For the *M. tuberculosis* infection, the number of *M. tuberculosis* phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 1 h after infection (D), the number of surviving *M. tuberculosis* was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 24 h after infection (E) and the bactericidal activity was calculated (F). Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 were determined by two-way ANOVA follow by a Tukey's multiple comparisons test

cytosol in both Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages (Figure 7(G), top and bottom right panels). To confirm that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages contained phosphorylated coronin 1, total protein cell extracts were resolved using SDS-PAGE in the presence of Phostag, a functional molecule that binds proteins phosphorylated on serine and threonine residues, delaying their mobility on SDS-PAGE.<sup>32</sup> Separation of protein extracts from Wt macrophages on Phostag-SDS-PAGE revealed that coronin 1 was found mainly as a fast-migrating band, although a faint slow-migrating band was also evident (Figures 7(H), upper panel); as expected, exposing Wt macrophages to PMA clearly shifted coronin 1 migration, indicating coronin 1 phosphorylation (Figure 7(H), upper panel). Unlike that in naïve Wt macrophages, in *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages, coronin 1 was found mainly phosphorylated as a slow-migrating band, and PMA exposure did not further affect its migration (Figure 7(H), upper panel). Under normal SDS-PAGE conditions, coronin 1 was resolved as a single band with the expected molecular weight (55 kDa) in both naïve and PMA-treated macrophages independent of their genotype (Figure 7(H), middle panel). Together, these results indicate that IFN- $\gamma$  secreted by naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages promotes macropinocytosis in an autocrine manner by modulating coronin 1 phosphorylation

and cellular distribution. In accordance with this idea, hampering IFN- $\gamma$  signaling in naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages, using a blocking anti-IFN- $\gamma$  antibody, restored coronin 1 membrane distribution (Figure 7(I)). Finally, to confirm that the *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were reprogrammed to macropinocytosis, we analyzed macrophage morphology before and after *M. tuberculosis* infection using transmission electron microscopy. Consistent with the data shown above, the morphology of naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages matched that of the activated macrophages, presenting more and longer prolongations and increased ruffle formation characteristic of macropinocytosis<sup>15</sup> (Figure 8(A), upper panels). Upon exposure to *M. tuberculosis*, both Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages increased the number and length of membranous process (Figure 8(A), lower panels); however, the changes in *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were more dramatic, presenting longer pseudopods (Figure 8(B)). Consistent with the morphologic changes observed 15 min after infection, *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages captured more *M. tuberculosis* bacilli than Wt macrophages, and *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages captured 3 times more bacteria than Wt macrophages by 60 min (Figure 8(C)). Interestingly, this enhanced capacity to engulf *M. tuberculosis* was not accompanied by an increase in the number of lysosomes (Figure 8(D)). Together,



**FIGURE 5** Unstimulated or stimulated *Klf10*-deficient macrophages produced higher  $\text{IFN-}\gamma$  levels than wild-type macrophages.  $4 \times 10^5$  BMDMs were left untreated (-), stimulated with LPS (100 ng/ml), infected with *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1), or infected with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) for 1 h, as described under section *Materials and Methods*. TNF (A and C) and  $\text{IFN-}\gamma$  (B and D) levels secreted to the culture media were determined by ELISA 24 h later. Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  were determined by two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

these data show that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages are reprogrammed to undergo macropinocytosis through  $\text{IFN-}\gamma$  production and secretion in an autocrine fashion.

### 3.6 | *Klf10*<sup>-/-</sup> mice are resistant to Mycobacterium infection

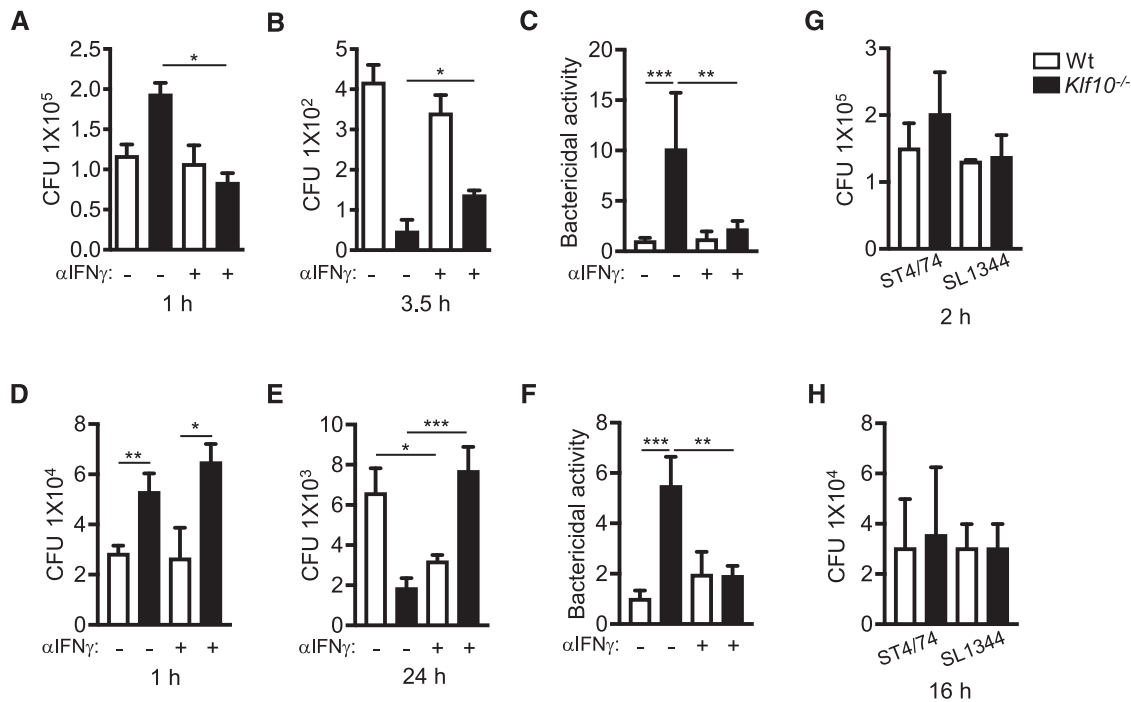
To evaluate the destructive capacity of *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages *in vivo*, we intratracheally infected mice with *M. tuberculosis* H37Rv strain and determined the bacterial loads 14- and 28-days postinfection. The lung bacterial loads between Wt and *Klf10*<sup>-/-</sup> mice were similar 14-days postinfection (Figure 8(E)). However, the lung bacterial load of Wt mice tripled 28-days postinfection (Figure 8(E)). In stark contrast, the bacterial load of *Klf10*<sup>-/-</sup> mice did not increase significantly and was considerably lower than that of Wt mice (Figure 8(E)). In accordance with the bacterial loads observed 28-days postinfection, all Wt mice died 43-days postinfection, whereas only 30% *Klf10*<sup>-/-</sup> mice died by the end of the experiment (Figure 8(F)). These data show that *Klf10*<sup>-/-</sup> mice are efficient at controlling *M. tuberculosis* H37Rv infection. Thus far, our results indicate that *M. tuberculosis* through *Klf10* prevents its destruction and establishes a successful infection.

### 3.7 | *M. tuberculosis* modulates *Klf10* gene expression in infected macrophages

To determine whether *M. tuberculosis* regulates *Klf10* gene expression during macrophage infection, MH-S mouse alveolar macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Ra or H37RV, and *Klf10* mRNA levels were determined using RT-qPCR. As early as 2 h after macrophage infection, a twofold increase in *Klf10* mRNA levels was observed in response to H37Ra nonpathogenic *M. tuberculosis* strain (Figure 9(A)), while the virulent H37Rv *M. tuberculosis* strain further increased *Klf10* mRNA levels, sixfold over basal levels (Figure 9(B)).

To assess the role of *KLF10* on *IFN-}\gamma* expression in TB, we determined *KLF10* and *IFN-}\gamma* mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and patients with active TB by qPCR. In agreement with previously published data,<sup>33</sup> we found no difference in *IFN-}\gamma* mRNA levels between healthy donors and TB patients (Figure 9(C)). In contrast, *KLF10* mRNA levels were reduced in TB patients when compared with those of healthy donors (Figure 9(D)). We next determined how *KLF10* and *IFN-}\gamma* mRNA levels varied between healthy donors and TB patients and noted that the healthy donors or TB patient with the higher *KLF10* mRNA levels showed the lowest *IFN-}\gamma* mRNA levels, while patients with lower *KLF10* mRNA levels showed elevated *IFN-}\gamma* mRNA levels (Figures 9(E) and 9(D)).





**FIGURE 6** IFN- $\gamma$  mediates the enhanced phagocytic and bactericidal activities of the Klf10-deficient macrophages.  $1.5 \times 10^5$  BMDMs were treated with anti-IFN- $\gamma$  (500 ng/ml) or isotype control (-) antibodies for 12 h before infection with *E. coli* (MOI 10:1) (A–C), or with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D–F). The number of *E. coli* (A) or *M. tuberculosis* H37Rv (D) phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 1 h after infection. The number of surviving *E. coli* (B) or *M. tuberculosis* H37Rv (E) were determined by culturing bacteria from macrophages lysates at the indicated times and the bactericidal activity against *E. coli* (C) or *M. tuberculosis* H37Rv (F) was calculated.  $2 \times 10^5$  wild-type (Wt) or Klf10-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were infected with ST4/74 or SL1344 *Salmonella typhimurium* strains (MOI 10:1). The number of *S. typhimurium* phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 2 h after infection (G). The number of surviving *S. typhimurium* was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 16 h after infection (H). Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Panels (A)–(F) were determined by two-way ANOVA follow by a Tukey's multiple comparisons test. Panels (G) and (H) were determined by one-way ANOVA follow by a Tukey's multiple comparisons

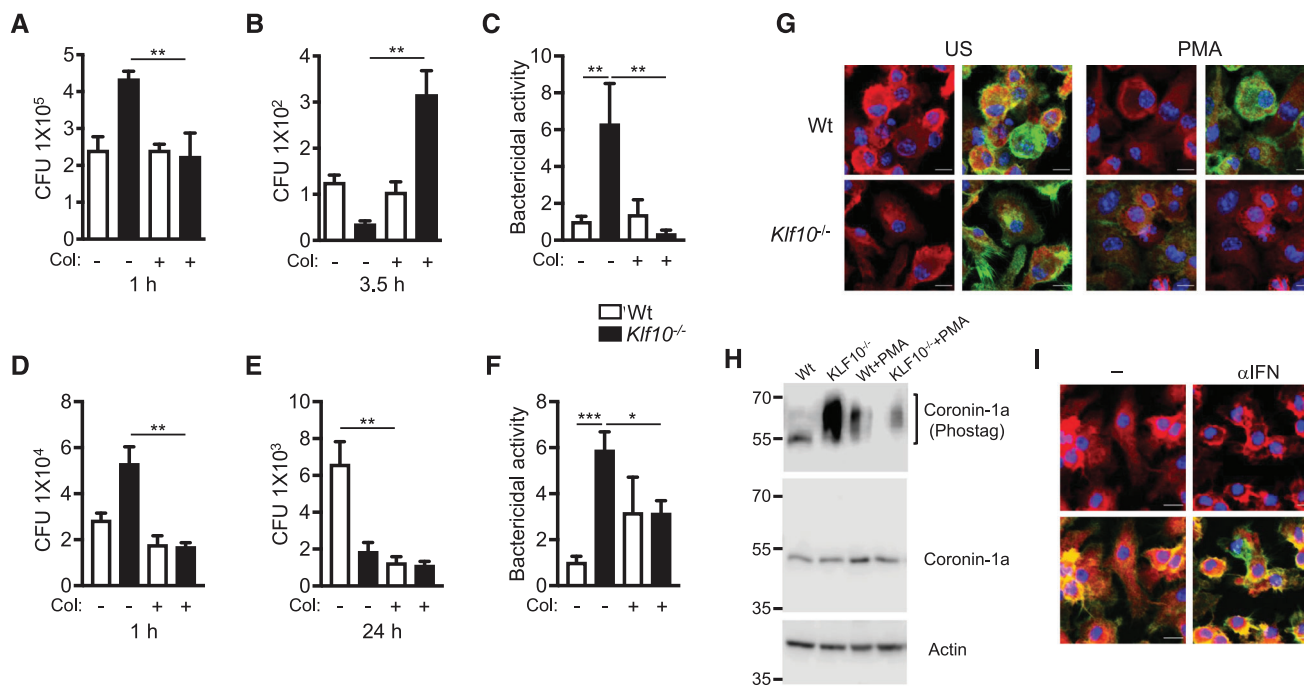
Due to the limited sample number and the lack of access to alveolar macrophages from TB patients, we were not able to establish a negative correlation between KLF10 and IFN- $\gamma$  expression in TB patients. Altogether, our data strongly suggest that *M. tuberculosis* promotes Klf10 gene expression leading to KLF10-mediated negative regulation of IFN- $\gamma$ , thus hampering macrophage switching to macrophage maturation, hence *M. tuberculosis* survival and host infection.

## 4 | DISCUSSION

*M. tuberculosis* is one of the most infectious pathogens worldwide. Even though there is a vaccine and treatments of first, second, and third line, one-third of the global population is still infected with this bacillus.<sup>34–36</sup> *M. tuberculosis* has developed strategies to avoid innate and adaptive immune systems.<sup>37,38</sup> Importantly, *M. tuberculosis* promotes the establishment of an anti-inflammatory environment by attenuating the expression of proinflammatory cytokines, such as TNF, IL-1 $\beta$ , and IL-6, and enhancing the expression of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$ , to reduce the proliferation and destructive activity of macrophages and the activation of the adaptive immune response.<sup>26,39</sup>

Generally, macrophages are effective in controlling and destroying *M. tuberculosis*, either by the fusion of *M. tuberculosis*-containing phagosomes with lysosomes or encapsulating *M. tuberculosis* in apoptosomes so that they can be recognized by other phagocytic cells and activate the adaptive immune system.<sup>40,41</sup> However, under certain conditions, *M. tuberculosis* avoids destruction.<sup>42</sup> Although several studies have discussed the molecular mechanism deployed by *M. tuberculosis* for survival and proliferation inside phagosomes, little is known about the *M. tuberculosis*-induced genetic regulation of the host cells to promote its survival and the establishment of an anti-inflammatory environment that sustains infection.

In this study, we describe a novel role for the transcriptional factor Klf10 in pathogens destruction and infectious disease development. It has been previously reported that Klf10 KO induces systemic inflammation.<sup>43,44</sup> Papadakis et al.<sup>43</sup> found that *Klf10*<sup>-/-</sup> colon macrophages showed an activated phenotype, expressing high levels of Ly6c and producing more TNF and IL-6 in response to LPS than Wt macrophages.<sup>44</sup> Accordingly, we found that in addition to LPS stimulation, more *Klf10*<sup>-/-</sup> BMDMs express Ly6c than Wt BMDMs upon *M. tuberculosis* infection, and that Ly6c<sup>+</sup> *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages present higher Ly6c levels on the surface than Ly6c<sup>+</sup> Wt macrophages. Additionally, we found that *M. tuberculosis*-infected *Klf10*<sup>-/-</sup> BMDMs

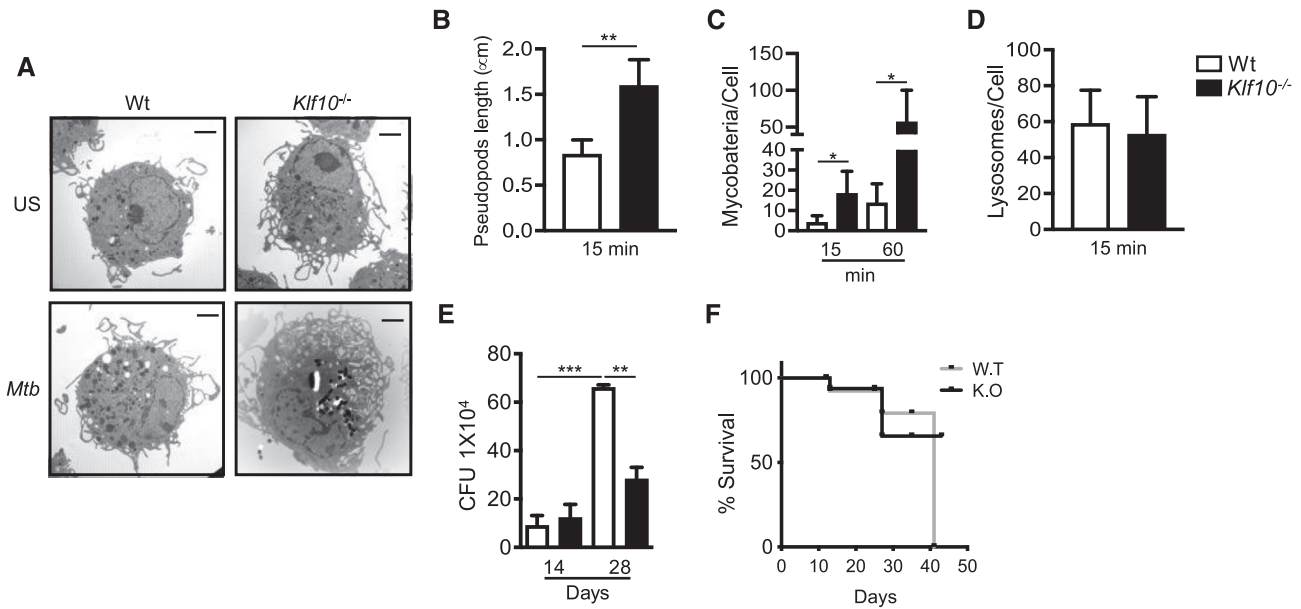


**FIGURE 7** Colchicine reduces the phagocytic and destructive properties of the *Klf10*-deficient macrophages.  $1.5 \times 10^5$  wild-type (Wt) or *Klf10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were left untreated (-) or treated with 100  $\mu$ g/ml colchicine (Col) for 30 min before infection with *E. coli* (MOI 10:1) (A–C) or *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (D–F). The number of *E. coli* (A) or *M. tuberculosis* H37Rv (D) phagocytosed was determined by culturing bacteria from macrophages lysates 1 h after infection. The number of surviving *E. coli* (B) or *M. tuberculosis* H37Rv (E) were determined by culturing bacteria from macrophages lysates at the indicated times and the bactericidal activity against *E. coli* (C) or *M. tuberculosis* H37Rv (F) was calculated. (G)  $5 \times 10^4$  wild-type (Wt) or *Klf10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were left untreated (US, left panels) or treated with PMA (50 ng/ml) (right panels) overnight. Cells were fixed and stained as described under section *Materials and Methods* and analyzed by confocal microscopy. Images were taken with at 40 $\times$  with a 5 $\times$  zoom. Coronin 1 (red) was visualized using specific antibodies. Nuclei were stained with Dapi (blue) and actin with phalloidin (green). Bar represents 10  $\mu$ m. (H)  $3 \times 10^5$  wild-type (Wt) or *KLF10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were left untreated (US) or treated with PMA (50 ng/ml) overnight. Cells were harvested and total cells extracts were prepared. Thirty micrograms of total cells extracts was resolved on regular SDS-PAGE gels or in gels containing 50  $\mu$ M Phostag and 50  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>. Coronin 1 and actin levels were determined using specific antibodies. (I) *Klf10*-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were treated with anti-IFN- $\gamma$  (500 ng/ml) or isotype control (-) antibodies for 12 h. Cells were fixed and stained as described under section *Materials and Methods* and analyzed by confocal microscopy. Images were taken with at 40 $\times$  with a 5 $\times$  zoom. Coronin 1 (red) was visualized using specific antibodies. Nuclei were stained with Dapi (blue) and actin with phalloidin (green). Bar represents 10  $\mu$ m. Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Panels (A)–(F) were determined by two-way ANOVA follow by a Tukey's multiple comparisons test

produced more TNF and IL-6 than infected Wt macrophages, showing that *Klf10*<sup>-/-</sup> BMDMs reach a higher activation state than Wt BMDMs in response to different stimuli. In line with this idea, our data show, for the first time, that *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages are 3–4 times more efficient in destroying *E. coli*, nonvirulent (H37Ra) and virulent (H37Rv) *M. tuberculosis* strains than Wt macrophages. Since *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages produce twice as much IFN- $\gamma$  as naïve Wt macrophages, we found that the enhanced phagocytic and bactericidal activity shown by the naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages resulted from increased basal IFN- $\gamma$  production, as culturing *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages in conditioned media from Wt macrophages or blocking IFN- $\gamma$  with specific antibodies dramatically diminished their bactericidal activity. These results suggest that Klf10 negatively regulates IFN- $\gamma$  gene expression in naïve macrophages, thereby preventing the establishment of an unwanted inflammatory environment under homeostatic conditions. In line with this idea, we found using bioinformatic analysis that the mouse IFN- $\gamma$  promoter contains 4 potential binding sites for Klf10, 3 of which are

CACCC boxes (Figure S1). Additionally, the element located at -281 bp from the transcription initiation site is conserved in the human IFN- $\gamma$  promoter. In agreement with this, it was recently found that KLF10 binding to a CACCC box located -256 bp from the transcription initiation site on the IL-12p40 promoter suppresses transcription.<sup>45</sup> Furthermore, Klf10 overexpression in T regulatory lymphocytes decreases IFN- $\gamma$  production.<sup>18</sup> This suggests that Klf10 can directly inhibit IFN- $\gamma$  gene expression by binding to the CACCC elements on the IFN- $\gamma$  promoter. Since IFN- $\gamma$  levels in *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages were further increased upon *M. tuberculosis* infection than those of Wt macrophages, *M. tuberculosis* could impair IFN- $\gamma$  gene expression through Klf10 to attenuate macrophage activation and avoid destruction, which is being investigated currently.

TNF and IFN- $\gamma$  are cytokines that enhance macrophage engulfment and destructive activity against invading pathogens through the reprogramming of phagocytosis to macropinocytosis, by modulating the cellular distribution and function of coronin 1. Coronin 1 is



**FIGURE 8** Klf10-deficient macrophages show morphologic changes characteristic of macropinocytosis and enhanced clearance activity against *M. tuberculosis* H37Rv.  $2.5 \times 10^6$  wild-type (Wt) or Klf10-deficient (*Klf10*<sup>-/-</sup>) BMDMs were left untreated (US) or infected with *M. tuberculosis* H37Rv (MOI 5:1) (*Mtb*) for the indicated time points. Cells were fixed and processed for transmission electron microscopy as described under section *Materials and Methods*. (A) Representative electron micrographs (15 min after infection); bar represents 2 μm. (B) Pseudopods length (μm). (C) Number of mycobacteria per cell. (D) Number of lysosomes per cell. (E) C57BL/6 wild-type (Wt) and *Klf10*<sup>-/-</sup> mice were infected with *M. tuberculosis* H37Rv ( $2.5 \times 10^5$ ) intratracheally. Lung bacterial load was determined 14- and 28-days postinfection ( $n = 3$  animals per infection time). (F) Survival curve, mice showing disease signs (prostration and body weight loss) were euthanized on day 43 ( $n = 6$  per group). Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Panels (B) and (D) were determined by unpaired t-test. Panels (C) and (E) were determined by one-way ANOVA follow by a Tukey's multiple comparisons test

associated to the cell membrane of inactivated macrophages and its retention in the phagosome membrane during *M. tuberculosis* infection prevents phagosome maturation and bacilli destruction.<sup>12</sup> In contrast, when macrophages are activated by TNF or IFN- $\gamma$ , coronin 1 relocates to the cytoplasm in a PKC-dependent manner. Coronin 1 phosphorylation on serine and threonine residues also promotes its interaction with sorting nexin 5 (Snx5) to induce PI3K activation and macropinocytosis initiation.<sup>14</sup>

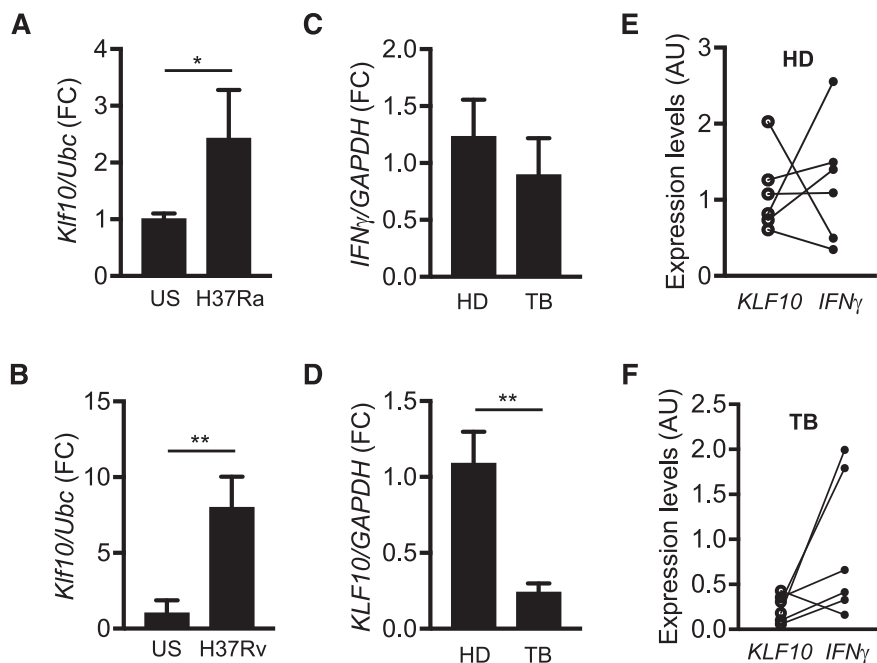
In as much as naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages produce IFN- $\gamma$ , a large coronin 1 fraction was observed as cytoplasmic puncta and was phosphorylated in unstimulated *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages. However, coronin 1 was associated with the cell membrane in unstimulated Wt macrophages and found mainly in its dephosphorylated form, whereas PMA stimulation phosphorylated and relocated coronin 1 to the cytosol. Furthermore, impairing IFN- $\gamma$  signaling in *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages restored coronin 1 membrane distribution resembling Wt macrophages. Together, these results suggest that IFN- $\gamma$  reprograms *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages to macropinocytosis. This idea is supported by the macropinocytosis inhibition experiments, whereby exposing *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages to colchicine before infection blunted their phagocytic and bactericidal functions. Moreover, electron microscopy analysis revealed that naïve *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages presented numerous and long pseudopods that increased upon *M. tuberculosis* infection. The length of Wt macrophage pseudopods also increased when exposed to *M. tuberculosis*; however, they were less and

shorter than those observed in the *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages. Furthermore, *Salmonella*-infected *Klf10*<sup>-/-</sup> macrophages showed phagocytic and bactericidal activity similar to that of Wt macrophages, which is in agreement with the fact that unlike *E. coli* or *M. tuberculosis*, *Salmonella* induces surface ruffling and macropinocytosis to be encapsulated and persist in a spacious phagosome.<sup>30,46</sup>

Consistent with the key role of IFN- $\gamma$  in TB control<sup>47,48</sup> and the fact that enhancing IFN- $\gamma$  levels *in vivo* induces a protective immune response against multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains,<sup>49</sup> our *in vivo* experiments showed that *Klf10*<sup>-/-</sup> mice controlled *M. tuberculosis* infection by significantly reducing the lung bacterial load. On day 28 after *M. tuberculosis* infection, the lung bacterial load of *Klf10*<sup>-/-</sup> mice was one-third of that of Wt animals. Moreover, Wt C57BL/6 mice did not survive *M. tuberculosis* infection beyond 40 days, while *Klf10*<sup>-/-</sup> mice survived and did not show signs of disease. Thus, KLF10 KO reprograms macrophages to macropinocytosis, enhancing the innate response against bacteria and controlling TB development, due to increased IFN- $\gamma$  expression and secretion.

Coinciding with this, our data indicating that *M. tuberculosis* induces *Klf10* expression in mouse bronchoalveolar macrophages together with data from previous reports showing increased KLF10 mRNA levels in human splenic macrophages as early as 6 h after infection with *M. tuberculosis* clinical isolates<sup>50</sup> and in cells from bronchoalveolar lavages from infected non-human primates<sup>51</sup> strongly suggest that *M. tuberculosis* negatively regulates IFN- $\gamma$  production in infected





**FIGURE 9** *KLF10* expression in murine alveolar macrophages infected with *M. tuberculosis* and peripheral blood cells from active tuberculosis patients.  $2.5 \times 10^5$  MHS alveolar macrophages were left unstimulated (US) or infected with *M. tuberculosis* H37Ra (A) or H37Rv (B) for 2 h. RNA was isolated and *Klf10* mRNA levels were determined by qPCR ( $n = 3$ ). Peripheral mononuclear cells were isolated from healthy donor (HD) or from patients with active tuberculosis (TB). RNA was isolated and *IFN-γ* (C) and *KLF10* (D) mRNA levels were determined by qPCR ( $n = 6$ ). *KLF10* and *IFN-γ* mRNA levels in peripheral mononuclear cells from healthy donor (E) and patients with active TB (F), with lines connecting data from the same individual. FC, fold change; AU, arbitrary units. Data represent the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Panels (A)–(D) were determined by unpaired t-test

macrophages by promoting *KLF10* expression. Although our data point to a negative correlation between *KLF10* and *IFN-γ* mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from TB patients, it is necessary to increase the sample to confirm this observation. In addition, we found reduced *KLF10* mRNA levels in mononuclear cells from patients with active TB compared with the levels found in healthy individuals. This agrees with different transcriptomic studies performed in macrophages obtained from lungs of *M. tuberculosis*-infected mouse models<sup>52,53</sup> and bronchoalveolar lavages<sup>54–56</sup> from human individuals, that found reduced *KLF10* mRNA levels compared with uninfected mice or healthy individuals, respectively. Reduced *KLF10* mRNA levels in cells from patients with active TB active could result from IL-10-mediated negative regulation of the *KLF10* gene expression,<sup>57</sup> since it has been shown that mononuclear cells from patients with active TB produce more IL-10 than cells obtained from patients with latent TB or healthy donors upon stimulation with tuberculin.<sup>58</sup> Additionally, it is well established that in an advance infection stages IL-10 favors TB development.<sup>59</sup> Overall, these data suggest that *M. tuberculosis*-mediated *KLF10* expression occurs at early stages, just after macrophages encounter *M. tuberculosis*, to ensure mycobacterium survival. While later in the infection, where IL-10 takes a central role for *M. tuberculosis* survival and disease progression, *KLF10* protein and mRNA levels are reduced by mechanisms yet to be defined. Nonetheless, further experiments aimed to determine *KLF10* gene expression

kinetics during macrophages in vivo infection by *M. tuberculosis* are required.

It has been considered that during *M. tuberculosis* infection, T lymphocytes, particularly Th-1 cells, are the most important *IFN-γ* source. Our results show that macrophages are also a significant source of *IFN-γ* that, in an autocrine manner, promotes a more efficient phagocytic and killing activity against mycobacteria, which is significantly controlled by *Klf10* expression.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We extend thanks to Dr. Subramaniam for the kind donation of the *Klf10* KO mice, to DVM Elizabeth Mata, DVM Gabriela Cabeza, and Oswaldo López for animal care, to MSc Erika Melchy and Biol. Jorge Ochoa for flow cytometry acquisition, and Dr. Jorge Barrios for technical help.

This work was supported by CONACyT (México) grant IFC2016-2282 to L. P.-M., grant Fon Inst./58/2016 to R. H.-P., and grant CF2019-40792 to G. P.-A.; and by DGAPA-UNAM/PAPIIT grant IN213119 to L. P.-M. and grant IN215119 to J. L. P.

E. M.-P. and I. S.-F. are PhD students enrolled in the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and recipients of a CONACyT fellowship (595318 and 448043, respectively). E. M.-P. was also partially supported by a DGAPA/PAPIIT scholarship, grant IN211719 to G. P.-A.

## DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

## AUTHORSHIP

Conceptualization, investigation, data curation, formal analysis, writing—original draft, writing—review and editing: E. M.-P. Investigation, formal analysis, writing—review and editing: D. M.-E. Investigation, formal analysis, writing—review and editing: J. C. L.-C. Investigation, formal analysis, writing—review and editing: I. S.-F. Investigation, formal analysis, writing—review and editing: S. D. de L.-G. Investigation, formal analysis, writing—review and editing: T. V. Writing—review and editing: J. L. P. Conceptualization, formal analysis, writing—review and editing: R. H.-P. Conceptualization, formal analysis, supervision, writing—review and editing: L. P.-M. Conceptualization, formal analysis, project demonstration, supervision, writing—original draft, writing—review and editing: G. P.-A. All authors revised the manuscript and approved its final version.

## REFERENCES

- Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:463-496.
- Jeremiah C, Petersen E, Nantanda R, et al. The WHO Global Tuberculosis 2021 Report – not so good news and turning the tide back to End TB. *Int J Infect Dis.* 2022;5:8.
- Gengenbacher M, Kaufmann SHE. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:514-532.
- Pieters J. Review Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbes.* 2008;399-407.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. *Nature.* 2013;496:445-455.
- Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity.* 2016;44:463-475.
- Peterson PK, Gekker G, Hu S, et al. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun.* 1995;63:1598-1602.
- Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, et al. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990;144:2771-80.
- Armstrong Byja, Hart Apda. Response of cultured macrophages to mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med.* 1971;134:713-740.
- Liu PT, Modlin RL. Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:371-376.
- Soldati T, Neyrolles O. Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic.* 2012;13:1042-1052.
- Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, et al. Survival of Mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell.* 2007;130:37-50.
- Pieters J. Coronin 1 in innate immunity. *Subcell Biochem.* 2008;48:116-123.
- BoseDasgupta S, Pieters J. Inflammatory stimuli reprogram macrophage phagocytosis to macropinocytosis for the rapid elimination of pathogens. *PLoS Pathogen.* 2014;10:1-18.
- Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev.* 2008;9:639-649.
- Swanson JA, King JS. The breadth of macropinocytosis research. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2019;374:1-5.
- Subramaniam M, Harris SA, Oursier MJ, et al. Identification of a novel TGF- $\beta$ -regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4907-4912.
- Cao ZX, Wara AK, Icli B, et al. Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta 1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells. *J Biol Chem.* 2009;284:24914-24924.
- Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32:23-63.
- Martínez-armenta M, Diaz de Leon-Guerrero S, Catalán A, et al. Molecular and Cellular Endocrinology TGF $\beta$ 2 regulates hypothalamic Trh expression through the TGF $\beta$  inducible early gene-1 (TIEG1) during fetal development. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;400:129-139.
- Papadakis KA, Krempsi J, Svingen P, et al. Krüppel-like factor KLF10 deficiency predisposes to colitis through colonic macrophage dysregulation. *Am J Physiol Cell.* 2015;900-909.
- Biology C, Huang L, Chang H, et al. The International Journal of Biochemistry Klf10 deficiency in mice exacerbates pulmonary inflammation by increasing expression of the proinflammatory molecule NPRA. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;79:231-238.
- Subramaniam M, Gorny G, Johnsen SA, et al. TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol.* 2005;25:1191-1199.
- Torres Tejerizo G, Bañuelos LA, Cervantes L, et al. Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J Microbiol Methods.* 2015;117:155-163.
- Bongiovanni B, Mata-Espinosa D, D'Attilio L, et al. Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis.* 2015;95:562-569.
- Villaseñor T, Madrid-Paulino E, Maldonado-Bravo R, et al. Mycobacterium bovis BCG promotes IL-10 expression by establishing a SYK/PKC $\alpha$ / $\beta$  positive autoregulatory loop that sustains STAT3 activation. *Pathog Dis.* 2019;77:1-11.
- Hernández-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado H a., et al. 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.* 2006;144:264-272.
- Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, et al. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology.* 1998;68:345-354.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25:402-408.
- Alpuche-Aranda BCM, Esther L, Swanson J a, et al. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp Med.* 1994;179:601-608.
- Rosales-Reyes R, Pérez-López A, Sánchez-Gómez C, et al. Salmonella infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microb Pathog.* 2012;52:367-374.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Separation and detection of large phosphoproteins using phos-tag sds-page. *Nat Protoc.* 2009;4:1513-1521.
- Zhang M, Lin Y, Iyer D V, et al. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1995;63:3231-3234.
- Yew WW. Directly observed therapy, short-course: The best way to prevent multidrug-resistant tuberculosis. *Chemotherapy.* 1999;45:26-33.
- Fine PEM. Vaccines, genes and trials. *Novartis Found Symp.* 1998;57-72.
- Maher D, Nunn P. Commentary: making tuberculosis treatment available for all. *Bull World Health Organ.* 1998;76:125-126.

37. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol*. 2007;27:347-362.
38. Baena A, Porcelli SA. Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: review article. *Tissue Antigens*. 2009;74:189-204.
39. Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, et al. Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor  $\beta$ 1 and interleukin-10. *Infect Immun*. 1999;67:5730-5735.
40. Srinivasan L, Ahlbrand S, Briken V. Interaction of mycobacterium tuberculosis with host cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4:1-15.
41. Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*. 2010;8:44-54.
42. Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:668-674.
43. Papadakis KA, Krempski J, Reiter J, et al. Krüppel-like factor KLF10 regulates transforming growth factor receptor II expression and TGF- $\beta$  signaling in CD8+ T lymphocytes. 2015;1:362-371.
44. Huang LT, Chang HW, Wu MJ, et al. Klf10 deficiency in mice exacerbates pulmonary inflammation by increasing expression of the proinflammatory molecule NPRA. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;79:231-238.
45. Zhang W, Wang X, Xia X, et al. Klf10 inhibits IL-12p40 production in macrophage colony-stimulating factor-induced mouse bone marrow-derived macrophages. *Eur J Immunol*. 2013;43:258-269.
46. Francis CL, Ryan TA, Jones BD, et al. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*. 1993;364:639-642.
47. Donovan ML, Schultz TE, Duke TJ, et al. Type I interferons in the pathogenesis of tuberculosis: Molecular drivers and immunological consequences. *Front Immunol*. 2017;8:1-16.
48. Zhang G, Deweerdt NA, Stifter SA, et al. A proline deletion in IFNAR1 impairs IFN-signaling and underlies increased resistance to tuberculosis in humans. *Nat Commun*. 2018;9:1-9.
49. Mata-Espinosa DA, Mendoza-Rodríguez V, Aguilar-León D, et al. Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon- $\gamma$  in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol Ther*. 2008;16:1065-1072.
50. López-Agudelo VA, Baena A, Barrera V, et al. Dual RNA sequencing of Mycobacterium tuberculosis-infected human splenic macrophages reveals a strain-dependent host-pathogen response to infection. *Int J Mol Sci*. 2022;23:1-22.
51. Mehra S, Foreman TW, Didier PJ, et al. The DosR regulon modulates adaptive immunity and is essential for Mycobacterium tuberculosis persistence. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:1185-1196.
52. Looney M, Lorenc R, Halushka MK, et al. Key macrophage responses to infection with Mycobacterium tuberculosis are co-regulated by microRNAs and DNA methylation. *Front Immunol*. 2021;12:1-14.
53. Plumlee CR, Duffy FJ, Gern BH, et al. Ultra-low dose aerosol infection of mice with Mycobacterium tuberculosis more closely models human tuberculosis. *Cell Host Microbe*. 2021;29:68-82.e5.
54. Pisu D, Huang L, Narang V, et al. Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *J Exp Med*. 2021;218:1-25.
55. Lavalett L, Rodriguez H, Ortega H, et al. Alveolar macrophages from tuberculosis patients display an altered inflammatory gene expression profile. *Tuberculosis*. 2017;107:156-167.
56. Raju B, Hoshino Y, Belitskaya-Lévy I, et al. Gene expression profiles of bronchoalveolar cells in pulmonary TB. *Tuberculosis*. 2008;88:39-51.
57. Fueki N, Sagara H, Akimoto K, et al. Interleukin-10 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling in cultured human bronchial epithelial cells. *Respiration*. 2007;74:454-459.
58. Tebruegge M, Dutta B, Donath S, et al. Mycobacteria-specific cytokine responses detect tuberculosis infection and distinguish latent from active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:485-499.
59. Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunol*. 2011;4:261-270.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Madrid-Paulino E, Mata-Espinosa D, León-Contreras JC, et al. Klf10 favors *Mycobacterium tuberculosis* survival by impairing IFN- $\gamma$  production and preventing macrophages reprogramming to macropinocytosis. *J Leukoc Biol*. 2022;112:475-490.  
<https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0422-288R>