



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE
ACTIVACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL
KLF10 MEDIADO POR *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS DURANTE LA INFECCIÓN DEL
MACRÓFAGO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

VERÓNICA YUTSIL GARCÍA RASILLA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

García
Rasilla
Verónica
Yutsil
+52 77 73 29 08 69
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
315098901

2. Datos del tutor

Dr.
Martín Gustavo
Pedraza
Alva

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Victor Julián
Valdés
Rodríguez

4. Datos del sinodal 2

Dr.
José Luis
Puente
García

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Leslie
Chávez
Galán

6. Datos del sinodal 4

Dra.
María Angélica
Santana
Calderón

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del mecanismo de activación del factor transcripcional KLF10
mediado por *Mycobacterium tuberculosis* durante la infección del macrófago
56 p.
2023

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.

“Trabajo realizado con el apoyo del Programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE200919 y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para el proyecto CF/2019-40792”

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

A la Licenciatura en Biología
Facultad de Ciencias, UNAM.

Al Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

Al Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,
UNAM.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,
UNAM.

Al Dr. José Luis Puente García
Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Al Dr. Edgardo Madrid Paulino
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,
UNAM.

Dr. David Valle García
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,
UNAM.

Dra. Karla Fabiola Meza Sosa
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,
UNAM.

Dr. Tomás Villaseñor Toledo
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología,
UNAM.

Dr. Rogelio Hernández Pando
Unidad de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición "Salvador Zubirán"

A los miembros del jurado:

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez (Presidente)
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. José Luis Puente García (Vocal)
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dra. Leslie Chávez Galán (Secretaria)
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Dra. María Angélica Santana Calderón (Secretaria)
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la vida, que me ha permitido llegar hasta este momento, colocándome frente a las personas y los lugares adecuados que me han enseñado a vivir y me han convertido en la mujer que actualmente soy.

A Angélica Rasilla, quien es el pilar más grande y fuerte de mi vida. Gracias por ser una mujer valiente, inteligente y perseverante que me ha enseñado que a salir adelante a pesar de los altibajos de la vida. Gracias por retarme constantemente a mis miedos, siempre de la mano de tu apoyo y amor incondicional.

A Agripino García, cuya presencia física hoy en día no me acompaña, pero su recuerdo siempre está presente en cada paso que doy. Gracias por tu tiempo y amor, por tu inteligencia, por enseñarme a no darme por vencida y siempre dar lo mejor de mi, por las risas y tu complicidad.

Al Dr. Gustavo Pedraza, por darme la oportunidad de estar por primera vez en un laboratorio de investigación y conocer todas las responsabilidades que implica hacer ciencia, por su apoyo, tiempo y paciencia. Y a la Dra Leonor Pérez, por permitirme estar en su laboratorio y realizar el presente proyecto.

Al Dr. Edgardo Madrid, por su invaluable tiempo, conocimiento y paciencia a lo largo de este proyecto, y por todas sus atenciones y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Karla Meza y al Dr. David Valle, por su tiempo, paciencia, amistad y hacerme sentir en casa fuera de ella.

Al laboratorio de Neuroinmunobiología del Instituto de Biotecnología (UNAM), por su amabilidad, compañerismo y retroalimentación durante mi estancia.

Al Dr. José Luis Puente, por su apoyo y abrirme las puertas hacia uno de los mejores institutos de investigación científica del país.

Al laboratorio de Inmunología Molecular y Celular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM), especialmente a la Dra. Paula Licona.

A mi familia, por su apoyo y los momentos compartidos. Especialmente a Sandra Garcia, por ser el lazo inquebrantable que nos mantiene unidos, y a Rufina Bautista, por su compañía, cariño y cuidado durante el tiempo que la vida nos permitió compartir.

A los compañeros de vida, mis amigos, quienes me han acompañado a crecer como persona y me han escuchado, tanto en los buenos como los malos momentos, sin esperar nada a cambio. Especialmente a Fer Arcos por ser mi compañía durante estos años al estudiar el sinuoso el camino de la Biología y la vida.

A todos ellos, muchas gracias, este trabajo está realizado con todo mi respeto y admiración hacia ustedes.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Tuberculosis	10
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i>)	11
<i>M. tuberculosis</i> invade a los macrófagos del hospedero y es capaz de sobrevivir dentro de ellos eludiendo la respuesta inmune	12
El sistema inmune y su papel en el control de la infección por <i>M. tuberculosis</i>	15
El granuloma	18
<i>Klf10</i> es un gen inducible por TGF β que inhibe la respuesta inflamatoria	19
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
Línea celular L929	26
Diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)	26
Cepa H37Ra de <i>M. tuberculosis</i>	27
Infección de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) con la cepa H37Ra de <i>M. tuberculosis</i>	27
Extracción de RNA	28
Transcripción inversa	29
Diseño de primers para qPCR	30

qPCR	31
ELISA	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
La expresión de <i>Klf10</i> incrementa en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) cuando son infectados con <i>M. tuberculosis</i>	33
La expresión de <i>Klf10</i> incrementa en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) al tratarlos con TGF β exógeno a tiempos cortos	34
La expresión de <i>Tgfβ2</i> aumenta en respuesta a una infección con <i>M. tuberculosis</i>	34
Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) tratados con <i>M. tuberculosis</i> presentan una disminución en la expresión de <i>Tgfβ1</i> y no exhiben un cambio en sus niveles proteicos de TGF β 1 a tiempos cortos postinfección	35
La expresión de <i>Klf10</i> disminuye en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) después de ser infectados con <i>M. tuberculosis</i> y tratarlos con anti-TGF β <small>¡Error! Marcador no definido.</small>	
DISCUSIÓN	38
REFERENCIAS	44
ANEXOS	51
Cultivo celular de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)	51
Estandarización de la extracción RNA a partir de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)	51
Estandarización de primers para qPCR de <i>Actb</i> , <i>Klf10</i> , <i>Tgfβ1</i> y <i>Tgfβ2</i>	53
Geles de integridad de RNA de las muestras experimentales	55

ABREVIATURAS

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Interferón gamma	IFN γ
Factor de necrosis tumoral	TNF
Factor de crecimiento transformante β	TGF β
Interleucina 10	IL10
Complejo mayor de histocompatibilidad clase II	MHC-II
Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs
Proteína quinasa G	PknG
Receptores de reconocimiento de patrones	PRR
Krüppel-like factor 10	KLF10
Macrófagos derivados de médula ósea	BMDMs
Multiplicidad de infección	MOI
RNA mensajero	mRNA
DNA complementario	cDNA
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Lipopolisacáridos	LPS
qPCR	PCR cuantitativa
Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico	cAMP

RESUMEN

M. tuberculosis es una bacteria patógena catalogada como el agente etiológico de la tuberculosis, una enfermedad que inicia por el depósito de la micobacteria en las superficies alveolares pulmonares donde es reconocida principalmente por macrófagos y células dendríticas, los cuales participan en la destrucción de *M. tuberculosis* mediante fagocitosis, o bien, en el aislamiento de la bacteria en granulomas. Sin embargo, la micobacteria ha desarrollado mecanismos para promover su supervivencia que evaden las respuestas inmunes del huésped, estableciendo un ambiente antiinflamatorio a través de promover la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF β . Previamente se demostró que la expresión del factor transcripcional *Klf10* permite la supervivencia de *M. tuberculosis* en el macrófago al inhibir la producción de IFN γ y no inducir la macropinocitosis. A su vez, se conoce que *Klf10* es un gen de respuesta temprana inducible por TGF β en osteoblastos fetales humanos. En el presente trabajo buscamos dilucidar si a través de TGF β , *M. tuberculosis* induce la expresión del factor transcripcional *Klf10* en macrófagos murinos para impedir una respuesta inflamatoria y promover su sobrevivencia.

Utilizando macrófagos derivados de médula ósea de ratones infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* o estimulados con TGF β 1 recombinante, y mediante técnicas como PCR cuantitativa y ELISA, identificamos que: i) tanto la infección con *M. tuberculosis* como la estimulación con TGF β 1 recombinante promueven la expresión del gen *Klf10* en macrófagos a tiempos tempranos, ii) la expresión de *Klf10* inducida por la micobacteria no involucra a TGF β , ya que la infección de los macrófagos con *M. tuberculosis* a los tiempos en los que *Klf10* se expresa, no se induce la expresión del mRNA de *Tgf β* ni incrementa los niveles proteicos de TGF β . Así, en conjunto nuestros datos indican que la expresión de *Klf10* en macrófagos infectados por *M. tuberculosis* es mediada a través de un mecanismo independiente TGF β .

INTRODUCCIÓN

Tuberculosis

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas y mortales de la humanidad, que actualmente representa un importante reto sanitario, social y económico a nivel mundial, principalmente en los países de ingresos bajos. Esta enfermedad figura dentro de los principales padecimientos que derivan en fallecimientos en todo el mundo, antes de la pandemia por coronavirus (COVID-19) era la principal enfermedad mortal causada por un solo agente etiológico, es decir, un microorganismo viable capaz de producir una enfermedad.

La probabilidad de desarrollar tuberculosis activa es mucho mayor entre las personas que padecen VIH, desnutrición, diabetes, tabaquismo, alcoholismo, cáncer y sistema inmune deprimido (OMS, 2022). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022), durante 2021, a nivel mundial, se estima que 10.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.3 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad. Geográficamente, en 2021, la mayoría de los casos de tuberculosis se produjeron en las regiones de la OMS de Asia Sudoriental (43 %), África (25 %) y el Pacífico Occidental (18 %), con porcentajes menores en el Mediterráneo Oriental (8,3 %), el América (3,0%) y Europa (2,3%) (Figura 1).

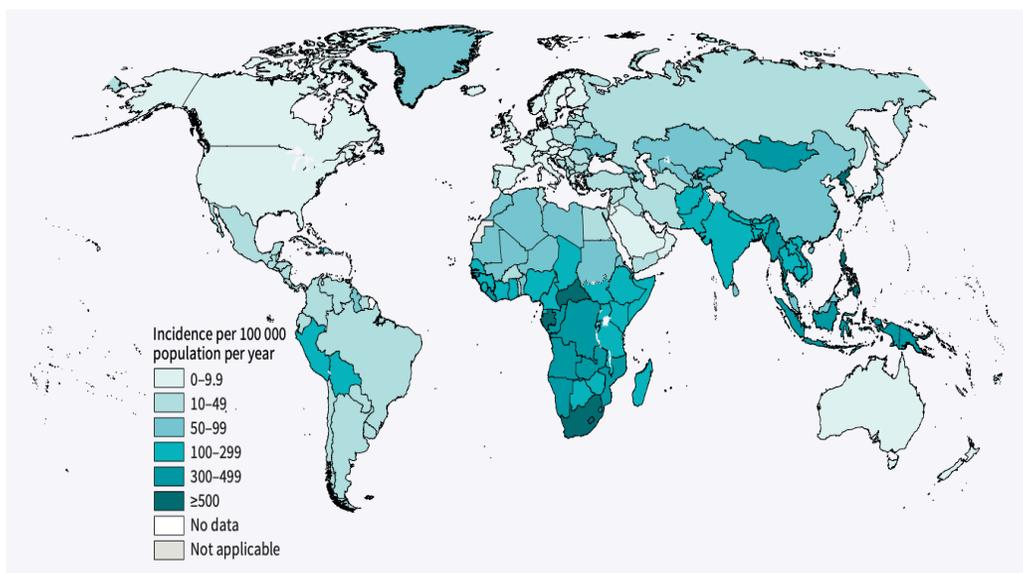


Figura 1. Incidencia de tuberculosis en 2021 por cada 100 000 habitantes. Se observa un mayor número de casos en países del continente africano y del continente asiático y un menor número de casos en países del continente europeo. Tomada de OMS (2022).

Esta enfermedad tiene diversas manifestaciones que afectan distintas áreas del cuerpo como los huesos, el sistema nervioso central, riñón y muchos otros órganos; sin embargo, es una enfermedad principalmente pulmonar que inicia por el depósito de *M. tuberculosis* en las superficies alveolares. A partir de este punto, la progresión de la enfermedad está determinada por la respuesta del sistema inmunológico del huésped (Smith, 2003); de esta forma, la infección por *M. tuberculosis* será asintomática siempre y cuando el sistema inmune logre eliminar o contener a la

bacteria en granulomas. Por el contrario, si el sistema inmune no logra detener la infección, la bacteria se disemina a otros órganos provocando síntomas en el paciente como tos persistente, pérdida de peso, fiebre, fatiga o debilidad, inflamación de los ganglios linfáticos, etcétera. (Suárez et al., 2019).

***Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)**

Es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta, de crecimiento lento, intracelular facultativa y protótrofa (Koch & Mizrahi, 2018). Su genoma es un cromosoma circular único y, a diferencia de la mayoría de las bacterias, *M. tuberculosis* no lleva a cabo una transferencia genética lateral, no presenta plásmidos y no realiza reordenamientos del genoma sino una expansión clonal, por lo tanto, presenta una baja diversidad genética. Sin embargo, es importante mencionar que la tasa de evolución del genoma de esta bacteria está relacionada con la aparición continua de mutaciones y rearrreglos cromosómicos (Galagan, 2014; Madigan et al., 2015).

Una de las principales características de esta bacteria es su envoltura celular, la cual está conformada principalmente por azúcares complejos y lípidos organizados en cuatro capas principales (Figura 2): (i) la membrana plasmática o membrana interna, (ii) el complejo peptidoglicano-arabinogalactano, (iii) la membrana externa que está unida covalentemente al complejo peptidoglicano-arabinogalactano a través de ácidos micólicos, y (iv) la cápsula, cuyos componentes median en las interacciones con las células fagocíticas (Kalscheuer et al., 2019). En conjunto, la envoltura celular le confiere una naturaleza hidrófoba a la superficie celular, por lo cual la bacteria presenta resistencia a la sequedad, tiene una fácil unión celular al hospedero y su supervivencia se ve favorecida (Koch & Mizrahi, 2018).

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que infecta principalmente los pulmones del hospedero, en este sitio la bacteria es reconocida por células del sistema inmune que participan en la fagocitosis e internalización de la bacteria en una estructura conocida como fagosoma que, al fusionarse con los lisosomas, forma un complejo llamado fagolisosoma y tiene por objetivo degradar a la bacteria (Rohde et al., 2007). Sin embargo, *M. tuberculosis* ha desarrollado mecanismos a través de los cuales evade las respuestas inmunes innatas y adaptativas del huésped que le permiten permanecer viable y establecer una infección exitosa y persistente.

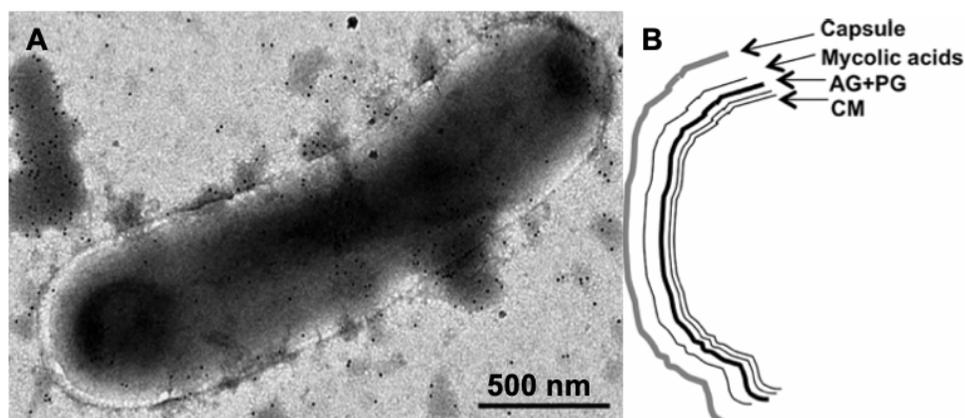


Figura 2. *M. tuberculosis* y las capas de su envoltura celular. A. Micrografía electrónica de *M. tuberculosis*. B. Modelo de las cuatro capas principales de la envoltura de *M. tuberculosis*: i) la membrana celular (CM); ii) el complejo arabinogalactano (AG) - peptidoglicano (PG); iii) la micomembrana, que es una membrana externa asimétrica formada de ácidos micólicos; y iv) la cápsula. Tomada de Kalscheuer et al., (2019).

***M. tuberculosis* invade a los macrófagos del hospedero y es capaz de sobrevivir dentro de ellos eludiendo la respuesta inmune**

Cuando el hospedero inhala aerosoles contaminados con la bacteria, estos alcanzan la zona alveolar del pulmón. En este sitio la bacteria interacciona con macrófagos alveolares mediante distintos receptores de reconocimiento de patrones (PRR), por ejemplo, receptores scavenger (SR), sensores de DNA citosólico, receptores de lectina tipo C (CLR), receptores Fc (FcR) y receptores tipo Toll (TLR), receptores de manosa, receptores de proteína surfactante A, CD14, CD43, receptores de inmunoglobulina y receptores del complemento (Songane et al., 2012; Nasiruddin et al., 2017; Queval et al., 2017; Torres-Huerta, 2017). Algunos de los ligandos microbianos que reconocen estos receptores son proteínas, glicoconjugados y lípidos complejos, como lipopolisacáridos, ácidos lipoteicoicos y lípidos micobacterianos (Wilson et al., 2015). Es importante resaltar que ninguno de los receptores es imprescindible para que se lleve a cabo la unión e internalización de la bacteria. Este proceso, por lo tanto, involucra más de un receptor y, según Brennan & Nikaido (1995), el hecho de que haya múltiples receptores para internalizar *M. tuberculosis* se relaciona con la compleja estructura de la superficie celular de la bacteria.

Una vez que la micobacteria ha sido reconocida por los receptores de los macrófagos, da inicio la fagocitosis, que se define como la captación celular de partículas (>0,5 μm) dentro de una envoltura de membrana plasmática (Gordon et al., 2016). A continuación, se describen los puntos clave del proceso de fagocitosis (Figura 3):

- Como primer paso, lleva a cabo la formación de la copa fagocítica. Para ello se necesita de la polimerización de actina en el sitio de ingestión; este proceso es regulado por las GTPasas Rho, las cuales actúan en respuesta a estímulos extracelulares, por ejemplo, ligandos de la micobacteria. En este punto también ocurre un estallido de superóxido, el cual es generado por el complejo NADPH ensamblado en la copa fagocítica.
- Posteriormente, la copa fagocítica se cierra y forma un fagosoma, el cual tiene asociadas V ATPasas que bombean protones al compartimiento interior de la estructura y acidificando el medio.
- Luego, los fagosomas experimentan eventos de fusión transitoria con múltiples orgánulos intracelulares, incluida la maquinaria endosomal de reciclaje, el aparato secretor sintético que incluye el retículo endoplásmico, los lisosomas secretores y los cuerpos multivesiculares.
- Finalmente, el fagosoma se fusiona con cuerpos lisosomales densos preexistentes lo que da lugar a un fagolisosoma. El interior de esta estructura se caracteriza por ser un ambiente ácido y oxidante, que puede degradar su contenido usando una variedad de enzimas hidrolíticas.

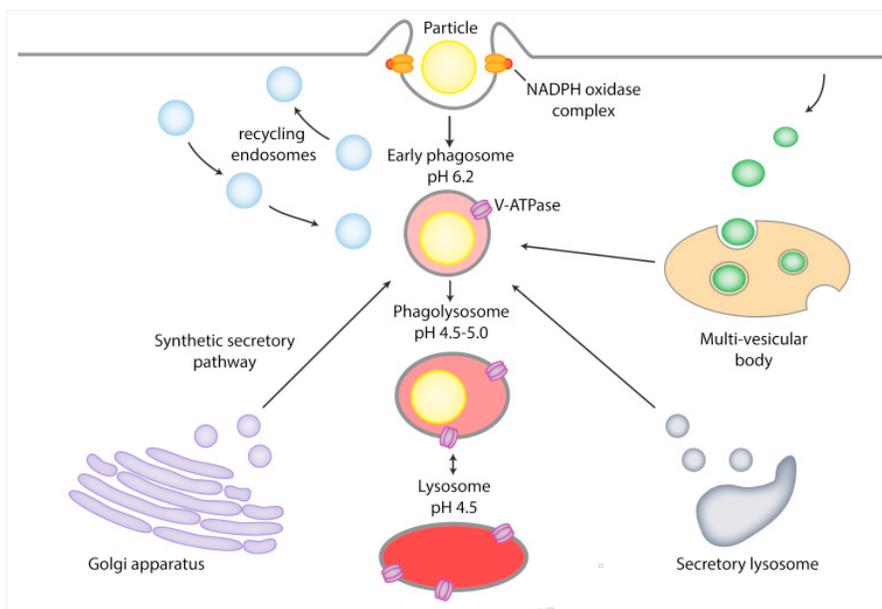


Figura 3. Fagocitosis. La internalización de partículas exógenas (por ejemplo, *M. tuberculosis*) es un proceso dinámico de invaginación, gemación y fusión de la membrana plasmática con membranas vesiculares intracelulares que resulta en la formación del fagosoma. Así mismo, ocurre una acidificación progresiva, que culmina en la fusión y digestión fagolisosomal. Tomada de Gordon et al. (2016).

Sin embargo, algunos bacilos pueden sobrevivir en este ambiente, de esta forma pueden permanecer en el pulmón o diseminarse a otros órganos del cuerpo (Kaufmann, 2001; Russell, 2001; Pieters, 2008).

Pieters (2008) señala que el reconocimiento de lípidos y glicolípidos de la superficie celular de la bacteria activan vías de señalización que aumentan las probabilidades de supervivencia de *M. tuberculosis* una vez dentro del macrófago. Por esta razón, la pérdida de componentes de la pared celular de las micobacterias se correlaciona con una virulencia reducida. En específico, el lipoarabinomano y la fosfatasa ácida de tipo eucariota (SapM) son componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* que interfieren con la fusión fagosoma-lisosoma. Esto lo hacen, evitando la acumulación de fosfatidilinositol 3-fosfato, el cual es un componente esencial para la generación de fagolisosomas (Saleh y Belisle, 2000; Vergne et al., 2005).

Otro mecanismo para eludir la respuesta inmune innata es llevado a cabo por la proteína cinasa G (PknG), la cual es secretada por *M. tuberculosis* cuando se encuentra en los fagosomas. Esta proteína se une al complejo de Golgi de los macrófagos e inhibe el reclutamiento de factores clave en la fusión del fagosoma con los lisosomas, por ejemplo, la fosfoinositol 3 cinasa, el autoantígeno 1 del endosoma temprano y la proteína 2 de membrana asociada al lisosoma (Walburger et al., 2004; Pradhan et al., 2018). Dado lo anterior, se ha demostrado que las micobacterias deficientes en PknG no pueden resistir la transferencia lisosomal y se degradan rápidamente. Además, el bloqueo de PknG permite a los macrófagos

redirigir a las micobacterias a los lisosomas, induciendo así su destrucción (Pieters, 2008; Walburger et al., 2004) (Figura 4).

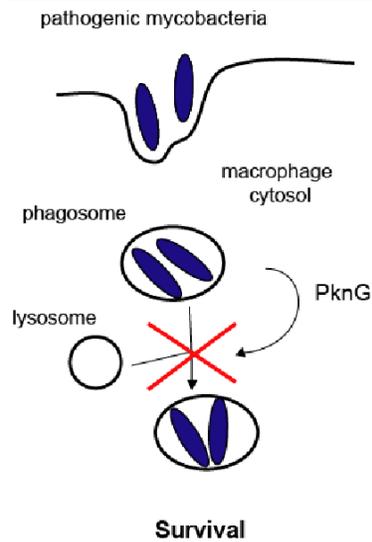


Figura 4. Modelo de la actividad de PknG para promover la supervivencia de *M. tuberculosis*. La micobacteria es fagocitada por los macrófagos, la proteína PknG se secreta en el citosol y evita la fusión del fagosoma micobacteriano con los lisosomas, lo que da como resultado la supervivencia de *M. tuberculosis*. Tomada de Sherr (2008), basada en Walburger et al., (2004).

M. tuberculosis también puede hacer uso de moléculas del hospedero para promover su supervivencia, este es el caso de coronina 1 (también conocida como P57 o TACO, por sus siglas en inglés, tryptophane aspartate-containing coat protein). De acuerdo con Gatfield y colegas (2005), una vez ocurrida la fagocitosis, la coronina 1 se acopla en la superficie citosólica del fagosoma e induce flujos de calcio. Estos flujos de calcio activan la fosfatasa calcineurina dependiente de Ca^{2+} , la cual actúa en la desfosforilación de proteínas involucradas en la fagocitosis. Así, se bloquea la formación del fagolisosoma (Figura 5) (Deghmane et al. 2007; Jayachandran et al., 2007; Pieters, 2008).

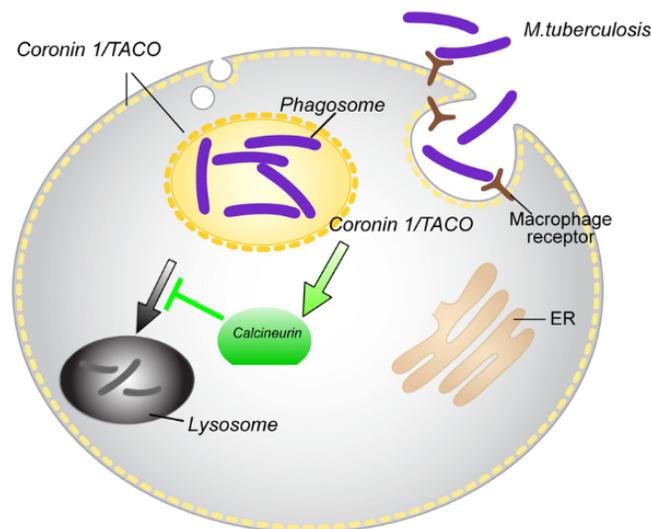


Figura 5. Modelo de la actividad de la coronina 1 en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Tras la entrada de las micobacterias en los fagosomas de los macrófagos mediada por receptores de macrófagos, coronina 1 es reclutada por el fagosoma donde están contenidas las micobacterias, la retención de coronina 1 conduce a la activación de la fosfatasa calcineurina dependiente de Ca^{2+} , que es responsable de bloquear la fusión fagosoma-lisosoma, lo que permite la supervivencia de *M. tuberculosis* (Tomada de Pieters, 2008).

Dado que la actividad antimicobacteriana de los macrófagos también está modulada por citocinas inflamatorias, como interferón gamma ($IFN\gamma$, por sus siglas en inglés) y TNF (factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés), y otras señales exógenas, como la vitamina D (Yuk et al. 2009; Upadhyay et al., 2018), *M. tuberculosis* ha desarrollado mecanismos a través de los cuales puede evadir la respuesta inmune adaptativa.

Por ejemplo, la activación prolongada del receptor tipo Toll 2 por la bacteria puede regular negativamente la expresión de algunas moléculas del MHC-II que normalmente serían inducidas por la señalización de $IFN\gamma$ en macrófagos (Harding y Boom 2010). Así mismo, los macrófagos reducen la expresión del MHC-II cuando son infectados por *M. tuberculosis*; de esta forma se disminuye su capacidad de presentar antígeno y, consecuentemente, existe una menor activación de linfocitos (Fulton et al., 2004).

M. tuberculosis también es capaz de promover la producción de citocinas con actividad inmunosupresora, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante β ($TGF\beta$, por sus siglas en inglés) impide la proliferación de los linfocitos T y B, disminuye la producción de $IFN\gamma$ y participa en la desactivación del macrófago (Olobo et al., 2001). Por otra parte, los componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* estimulan la producción de IL10, que inhibe la síntesis de TNF e $IFN\gamma$ por parte de linfocitos T, monocitos y macrófagos (O'Leary et al., 2011).

Villaseñor y colaboradores (2019) dilucidaron algunos factores clave en la regulación de la expresión de IL10. Partieron del hecho de que la producción de IL10 en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* depende de la activación de SYK (Zhang et al. 2009). Syk a su vez regula positivamente la actividad transcripcional de STAT3 en macrófagos. Los autores indican que la actividad de la isoforma PKC clásica ($PKC\alpha$ y $PKC\beta$) también es necesaria para mantener la actividad de SYK, la activación de $NF\kappa B$ y la fosforilación de STAT3 que da como resultado la expresión del gen de IL10. Por lo tanto, se concluye que al disrumpir las actividades de SYK y PKC, los niveles de IL10 se reducirían, y esto podría atenuar el ambiente antiinflamatorio y limitar la supervivencia y el crecimiento intracelular de las micobacterias.

El sistema inmune y su papel en el control de la infección por *M. tuberculosis*

El sistema inmune comprende los mecanismos de defensa de los organismos multicelulares que permiten reconocer lo propio de lo extraño, y así eliminar patógenos de manera eficiente. En general, existen dos tipos de respuestas del

sistema inmune, las cuales están estrechamente relacionadas y actúan en conjunto para proteger al organismo (Kindt et al., 2007):

- A. La respuesta inmune innata, la cual involucra los mecanismos moleculares y celulares que se encuentran en un individuo antes de que ocurra una infección, y actúa de forma rápida y no específica para eliminar al agente infeccioso, evitando así su propagación. Este tipo de respuesta agrupa a diferentes tipos celulares (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas y células cebadas).
- B. La respuesta inmune adaptativa, que incluye a células y moléculas que se dirigen específicamente al patógeno que está causando la infección, por lo tanto, se encarga de reconocer, suprimir y, posteriormente, recordar al agente infeccioso. Este tipo de respuesta depende de la acción de los linfocitos B, que son precursores de células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos que se unen específicamente al patógeno. También se necesita de las actividades de los linfocitos T: i) citotoxicidad, es decir, las células matan otras células que están infectadas con patógenos intracelulares que portan el antígeno; ii) cooperación, esto es, las células proporcionan señales, en forma de citocinas, que activan las funciones de otras células, como la producción de anticuerpos por parte de las células B y la eliminación de los patógenos mediante fagocitosis por los macrófagos; y iii) regulación, o sea, las células suprimen la actividad de otros linfocitos y ayudan a limitar el posible daño de las respuestas inmunes (Alberts et al., 2015; Murphy et al., 2009).

El primer contacto de *M. tuberculosis* al ingresar al organismo se realiza con las células epiteliales de las vías respiratorias, las cuales funcionan como barreras físicas y, a pesar de que son consideradas “células inmunes no profesionales”, son capaces de percibir la presencia de la micobacteria a través de un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) y cambiar la composición del líquido de la superficie de las vías respiratorias, mejorando su capacidad antimicrobiana (Li et al., 2012). Además, participan en la producción de citocinas inflamatorias y en la activación de células T invariantes asociadas a la mucosa que estimulan la producción de TNF e IFN γ (Harriff, 2014).

Cuando la micobacteria llega a la zona de los alvéolos pulmonares se encuentra con una población diversa de células inmunes compuesta principalmente por células dendríticas y los macrófagos, también hay presencia de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y células asesinas naturales, pero estas células tienden a ser menos prominentes en ausencia de inflamación (Smith, 2007).

Particularmente, los macrófagos son células mononucleares que, al reconocer un antígeno, en este caso a *M. tuberculosis*, pasan a un estado de activación y experimentan rearrreglos de la membrana plasmática y del citoesqueleto dando lugar a la fagocitosis, la cual se encarga de la absorción y degradación de antígenos. Así mismo, los macrófagos en estado activo expresan una mayor cantidad de moléculas del MHC-II que les permiten funcionar eficazmente como células presentadoras de antígeno (Kindt et al., 2007). También los macrófagos son

capaces de producir distintas moléculas inmunorreactivas, por ejemplo: i) citocinas, que estimulan y dirigen la respuesta inmune adaptativa (Kindt et al., 2007); ii) sustancias citotóxicas, capaces de destruir a *M. tuberculosis*, mediante mecanismos dependientes (el estallido respiratorio) e independientes de oxígeno (producción de lisozimas que digieren péptidos de las paredes bacterianas y funcionan como agentes antimicrobianos no específicos) (MacMicking et al., 1997); y iii) defensinas, las cuales son péptidos pequeños que forman canales permeables a iones en la membrana de las bacterias (Murray and Wynn, 2011).

Las actividades de los macrófagos se ven favorecidas por la presencia del IFN γ y de TNF, y hace que las células sean capaces de mejorar su capacidad fagocítica, incrementar su habilidad para eliminar a los microbios ingeridos, aumentar la secreción de mediadores inflamatorios y mejorar su facultad de activar células T (Alberts et al., 2015; Kindt et al., 2007; Pavón Romero et al., 2016).

También hay otras células del sistema inmune innato que participan en el curso de la infección por *M. tuberculosis*. Por ejemplo, las células dendríticas son células fagocíticas, al igual que los macrófagos, las células dendríticas se encuentran en un estado inactivo hasta que ocurre un reconocimiento de PAMPs a través de un PRR. Esto incrementa la capacidad fagocítica, induce la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad se inicia una cascada de transducción de señales en las células huésped que culmina en la activación del factor nuclear NF κ B y la posterior inducción de varios genes relacionados con la inmunidad (incluidas las citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras). De esta forma las células dendríticas participan tanto en la fagocitosis del patógeno como en la presentación de antígenos y, por tanto, en la inducción de una respuesta específica de antígeno, además participan en la producción de citocinas con actividad sobre linfocitos T CD4⁺ (Khan et al., 2016).

Por su parte, los linfocitos T CD4⁺, en particular las células Th1, desempeñan un papel fundamental durante la infección por *M. tuberculosis* al mediar la protección, contribuir a la inflamación y regular la respuesta inmunitaria (Lyadova & Panteleev, 2015). Los linfocitos T CD4⁺ Th1 contribuyen a la protección contra la tuberculosis al secretar citocinas Th1 (por ejemplo, TNF e IFN γ), por lo cual juegan un papel fundamental en el proceso de activación de macrófagos y en la maduración del fagosoma. Para que los linfocitos lleven a cabo sus funciones es necesario que se encuentren en un estado activo, para ello las células dendríticas, fagocitan a la bacteria en el sitio de la infección y se trasladan a los ganglios linfáticos para realizar la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (mediante el MHC-II). Consecuentemente, esta células experimentan un proceso de activación y expansión de las poblaciones específicas para los antígenos de la micobacteria, iniciando así la respuesta inmune adaptativa (De Martino et al., 2019; Jasenosky et al., 2015).

En particular, el IFN γ es sumamente relevante en el control de infecciones causadas por bacterias intracelulares como *M. tuberculosis*. La interacción de esta citocina

con su receptor activa a los macrófagos alveolares al inducir la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta inmune (por ejemplo, MHC-II). Asimismo, induce la acidificación del fagosoma y la fusión fagosoma-lisosoma y disminuye la disponibilidad de hierro intracelular (Herrera-Barrios et al., 2005; Boehm et al. 1997). Estudios realizados por Cooper y colaboradores (1993) demostraron que los ratones que carecen del gen funcional para el IFN γ son incapaces de contener y controlar la infección por *M. tuberculosis*. Esto ocurre debido a que no es posible activar adecuadamente tanto los macrófagos infectados como los monocitos que llegan para detener el crecimiento progresivo de la infección. Igualmente, el IFN γ producido por los linfocitos T CD4⁺ Th1 es necesario para el control óptimo a largo plazo de la carga bacteriana (Green et al., 2013); esto se debe a que el IFN γ inhibe la replicación intracelular de *M. tuberculosis* en los macrófagos.

El granuloma

Una vez implantadas las respuestas inmunes innatas y adaptativas se establece un mecanismo complejo y bien coordinado entre ambas respuestas que terminará por destruir o confinar a *M. tuberculosis* en granulomas (De Martino et al., 2019). Un granuloma es un agregado compacto y organizado de células inmunes que surge en respuesta a un estímulo persistente. El granuloma se forma mediante la invasión de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* al epitelio pulmonar. Posteriormente, algunas de estas células sufren transformaciones para dar lugar a células epitelioides (que poseen una membrana celular que puede unirse a células adyacentes), células gigantes multinucleadas (resultado de la fusión de varios macrófagos) o células espumosas (macrófagos que se caracterizan por la acumulación de lípidos). Estas células inducen una respuesta inflamatoria mediante la producción de TNF, IL6 e IL12. Esto provoca el reclutamiento de neutrófilos, células NK, linfocitos B, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, fibroblastos y células que secretan componentes de la matriz extracelular, las cuales rodean a los macrófagos infectados, formando así los granulomas maduros (Figura 6). Estas estructuras generalmente se generan cuando el sistema inmune intenta aislar patógenos extraños que no pudo eliminar eficazmente. Al formarse el granuloma, el sistema inmune mantiene confinada a la bacteria, evitando que infecte a otras células, de esta forma el bacilo puede permanecer latente y la infección ser asintomática y no contagiosa. Sin embargo, esta estructura se puede ver comprometida por malnutrición, envejecimiento o inmunodeficiencia. En estos casos, el granuloma pasa a una fase de decaimiento y se vuelve una masa amorfa de desechos celulares, liberando a los bacilos, volviendo así a su forma infecciosa (Ramakrishnan, 2012).

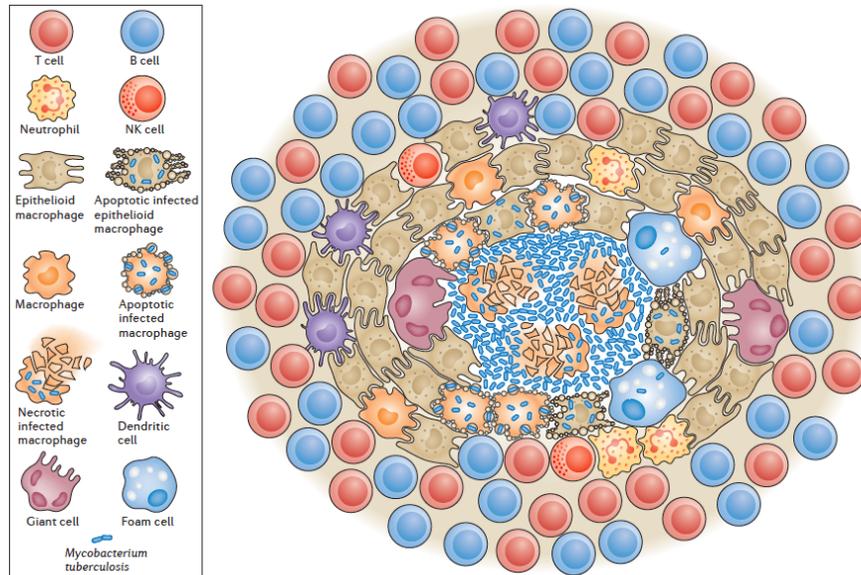


Figura 6. Estructura y componentes celulares del granuloma. El granuloma tuberculoso es un agregado compacto y organizado de células epitelioideas, macrófagos (que sufren o no una transformación), neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B y T, células NK, fibroblastos y células que secretan componentes de la matriz extracelular (Tomada de Ramakrishnan, 2012).

***Kif10* es un gen inducible por TGFβ que inhibe la respuesta inflamatoria**

TGFβ es una citocina antiinflamatoria que presenta tres isoformas (TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3), las cuales están codificadas por genes distintos, sin embargo, todas son mediadoras primarias de la señalización de esta citocina. TGFβ puede ser producido por múltiples linajes de leucocitos y células del estroma, se secreta de forma latente como un complejo formado por un dímero de TGFβ unido con la proteína asociada a la latencia (LAP, por sus siglas en inglés) y la proteína de unión a TGFβ latente (LTBP, por sus siglas en inglés). Es importante destacar que TGFβ únicamente puede unirse a sus receptores cuando se libera de la unión de LAP y LTBP (Figura 7) (Li & Flavell, 2008).

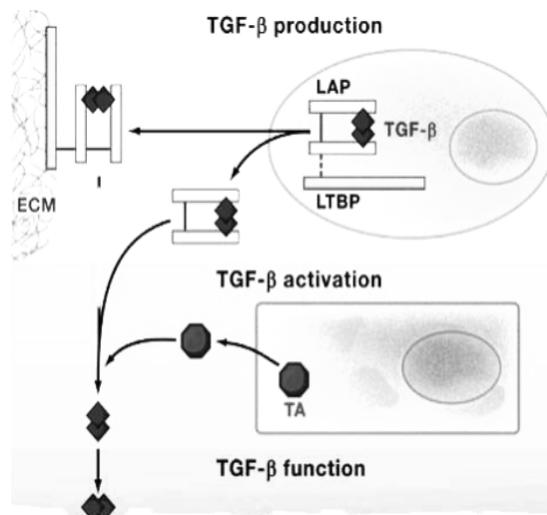


Figura 7. Regulación en la síntesis de TGFβ. TGFβ se sintetiza de forma inactiva debido a su asociación con las proteínas LAP y LTBP, la degradación o alteración de la conformación de estas proteínas por parte de un activador de TGFβ (TA) en respuesta a señales ambientales permite que TGFβ se pueda unir a sus receptores (Tomada de Li & Flavell, 2008).

Las isoformas de TGFβ son reconocidas por los tres receptores de TGFβ (TGFβR1, TGFβR2 y TGFβR3), de los cuales TGFβR1 y TGFβR2 son serina/treonina y tirosina quinasas, y regulan procesos celulares fundamentales como la proliferación, diferenciación, apoptosis, organización citoesquelética, adhesión y migración. Así mismo, estas isoformas están relacionadas con activinas, algunos factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Memon & Lee, 2018; Schmierer & Mill, 2007).

Las proteínas Smad son los principales mediadores intracelulares de la vía de señalización canónica de TGFβ, esta inicia cuando una de las tres isoformas de TGFβ se une a TGFβR2, que recluta y fosforila TGFβR1, el cual, a su vez, fosforila a Smad2 y Smad3; posteriormente se recluta a Smad4 que, en conjunto con Smad2 y Smad3, se transloca al núcleo para regular la transcripción de genes diana de TGFβ. Smad7 es un regulador negativo de la señalización canónica de TGFβ al inducir la degradación de TGFβR1. Así mismo, la unión de TGFβ con sus receptores también puede activar vías de señalización independientes de las proteínas Smad (señalización no canónica), estimulando una variedad de cinasas. Estas cinasas son capaces de fosforilar a Smad2 y Smad3, las cuales podrán unirse a Smad4 para trasladarse al núcleo y llevar a cabo la regulación de la transcripción de genes diana de TGFβ (Vander-Ark et al., 2018).

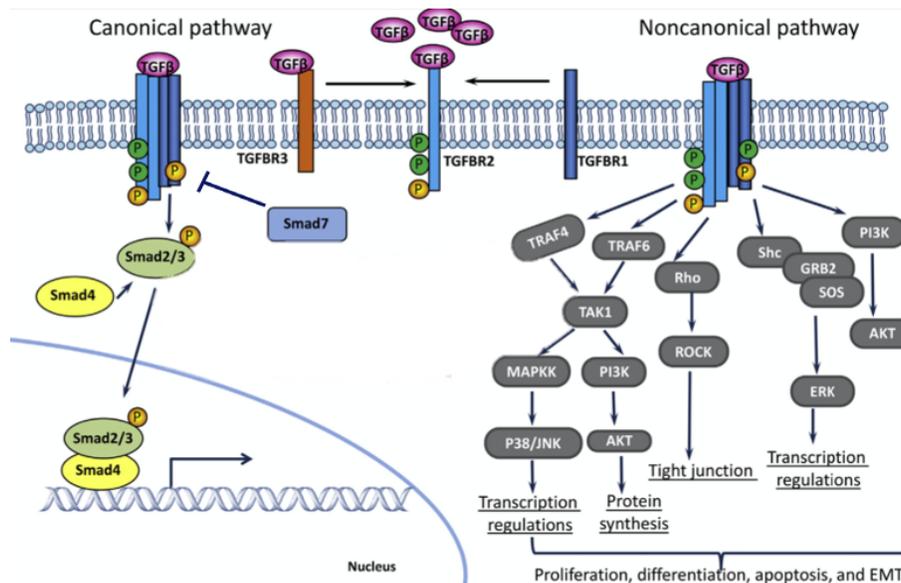


Fig. 8. Señalización canónica y no canónica de TGFβ. La señalización canónica se ejecuta a través de las proteínas Smad para controlar la transcripción de sus genes diana. La señalización no canónica se lleva a cabo a través de una variedad de cinasas (serina-treonina cinasas (AKT), fosfoinositol 3-cinasas (PI3K), c-Jun N-terminal cinasas (JNK), cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), cinasas P38 activadas por mitógenos (P38), cinasas activadas por TGFβ (TAK), cinasas asociadas a Rho (ROCK)) y otras proteínas como

las GTPasas Rho, las proteínas adaptadoras Shc, las proteínas unidas al factor de crecimiento (Grb), los factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS). EMT, transición epitelial-mesenquimal; en círculos verdes, fosforilación de tirosina quinasa; en círculos naranjas, fosforilación de serina/treonina quinasa (Tomado de Vander-Ark et al., 2018).

Kulkarni y colaboradores (1993) visualizaron algunas funciones específicas de TGF β al generar ratones Tgf β 1 $-/-$ los cuales desarrollaron un síndrome inflamatorio multifocal con infiltración masiva de linfocitos y macrófagos principalmente en el corazón y los pulmones, por lo cual, se concluyó que TGF β tiene un papel importante en la regulación homeostática de la proliferación y extravasación de células inmunitarias en los tejidos. Por otro lado, Werner y colegas (2000) demostraron que TGF β inhibe varias citocinas inflamatorias inducidas por LPS en macrófagos y contribuye a resolver la inflamación.

Ahora bien, de acuerdo con Olobo y colaboradores (2001), TGF β se expresa en sitios de infección por *M. tuberculosis* y tiene un papel fundamental en la inmunopatogénesis de la tuberculosis. Esta idea se sustenta en estudios realizados por Toossi y Ellner (1995) que demostraron que los monocitos de pacientes con tuberculosis tienen una mayor capacidad para secretar TGF β tras la estimulación in vitro con antígenos micobacterianos. Además, TGF β altera la producción y función de TNF, tiene un efecto inhibitor en la inducción del receptor de interleucina 12 y se requiere para la polarización de macrófagos M2 (Gong et al., 2012).

Cuando TGF β se une a sus receptores (TGF β R1 y TGF β R2), se activa la vía de señalización de Smad (canónica) y, con ello, la expresión de *KLF10* (*TIEG1*, gen de respuesta temprana inducible por TGF β) (Figura 9) (Subramaniam et al., 2010).

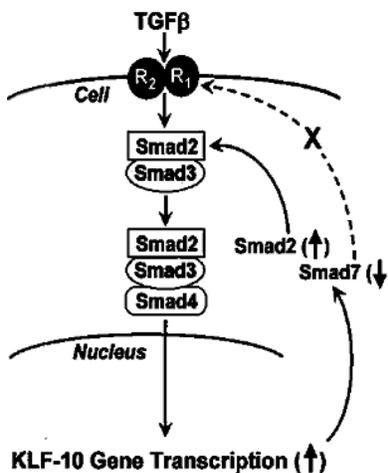


Figura 9. KLF10 y la vía de señalización canónica de TGF β . TGF β se une a sus receptores TGF β R1 (R1) y TGF β R2 (R2) activando así la vía de señalización canónica a través de las proteínas Smad; consecuentemente, se induce la expresión del mensajero de *Klf10*, el cual se traduce en la proteína KLF10, que actúa como represor de la expresión del gen Smad7 y, como activador del gen Smad2 (Tomado de Subramaniam et al., 2010).

KLF10 es un factor transcripcional que pertenece a la familia de factores tipo Krüppel (KLFs, por sus siglas en inglés), la cual agrupa una serie de reguladores transcripcionales que se caracterizan por tener en el extremo carboxilo tres dedos de zinc tipo C2H2, estos permiten la unión al DNA en secuencias ricas en GC, como los elementos CACCC presentes en los promotores proximales de genes eucariotas. En el extremo amino terminal de los KLFs se ubican los dominios reguladores que les permiten interactuar con coactivadores y/o correpresores, culminando en la activación o represión de una determinada actividad promotora (Swamynathan, 2010). Hasta el momento, se han identificado un total de 18 miembros de KLFs de mamíferos y, según la nomenclatura, se denominan KLF1-KLF18 (Memon & Lee, 2018). Cada miembro de la familia presenta dominios reguladores variables, por lo que tienen una secuencia del DNA propia; así mismo, tienen modificaciones post-traduccionales distintas (Bialkowska et al., 2017; Pearson et al., 2008).

KLF10 inicialmente se identificó en el núcleo de osteoblastos fetales humanos. Posteriormente, mediante estudios inmunohistoquímicos, se reconoció su presencia en células epiteliales de la placenta, mama y páncreas, así como en células de músculo liso y esquelético, células cardíacas, células gliales, fibroblastos, células de carcinoma pancreático, células de la corteza cerebral y del cerebelo, células mieloides, osteoblastos y células de la médula ósea (Subramaniam et al., 2010). Recientemente se observó que en respuesta a una infección con *M. tuberculosis* se induce la expresión de *Klf10* macrófagos broncoalveolares de ratón (Madrid-Paulino et al., 2022), así mismo, se incrementan los niveles de mRNA de *KLF10* después de una infección con la micobacteria en macrófagos esplénicos humanos (López-Agudelo et al., 2022) y en células de lavados broncoalveolares de primates no humanos (Mehra et al., 2015).

KLF10 funciona como regulador de la transcripción de genes que participan principalmente en la proliferación celular y en la inducción de la apoptosis. Por lo tanto, tiene un papel importante en múltiples procesos biológicos y estados patológicos, por ejemplo, la apoptosis, la proliferación, la diferenciación, el desarrollo neuronal y la inflamación (Subramaniam et al., 1995; Cao et al., 2009; Biology et al., 2016). Los ratones deficientes en *Klf10* se describieron por primera vez por Subramaniam y colaboradores (2005) y actualmente se utilizan ampliamente para determinar su papel en diferentes procesos celulares y enfermedades. De acuerdo con Subramaniam y colegas (2010), la ablación del gen *Klf10* en ratones da como resultado múltiples fenotipos, incluidos defectos en el esqueleto, el corazón y los tejidos conectivos.

En 2015 Papadakis y colaboradores observaron que ratones deficientes de *Klf10* tienen un mayor número de células T CD8⁺ efectoras y de memoria y producen más IFN γ después de la estimulación con péptidos virales *in vitro*. Así mismo, KLF10 juega un papel importante en la diferenciación de los macrófagos intestinales hacia un fenotipo antiinflamatorio que contribuye a la regulación de la colitis *in vivo* (Cao et al., 2010). Esto sugiere que KLF10 es un represor transcripcional de citocinas inflamatorias en macrófagos (Zhang et al., 2013). De acuerdo con esto, en

respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos deficientes de *Klf10* producen mayores niveles de citocinas inflamatorias y menores niveles de citocinas antiinflamatorias que los macrófagos silvestres (Madrid-Paulino et al., 2022).

Así mismo, KLF10 puede participar en la regulación de genes diana de TGF β al unirse a regiones promotoras de genes que codifican componentes de la vía de señalización de TGF β , regulando así la duración e intensidad de la respuesta de TGF β y originando estado de retroalimentación positiva (Spittau & Krieglstein, 2011). Cao y colaboradores (2009) demostraron que KLF10 se une a la región promotora del gen *Tgf β 1* para aumentar la expresión y la posterior liberación de TGF β 1 de las células T CD4⁺. En este sentido, TGF β 1 actúa de manera autócrina para activar la vía de señalización de TGF β y esto conduce a respuestas mejoradas de TGF β . Además, este estudio indica que KLF10 sirve como una molécula antiinflamatoria para mejorar la señalización de TGF β y suprimir las respuestas inflamatorias de las células inmunes.

Otra forma en la que KLF10 puede influir en la señalización de TGF β en una célula es regulando la expresión de los receptores de TGF β . Papadakis y colegas (2015) demostraron que KLF10 puede unirse directamente al promotor del gen *Tgf β 2* en las células T, y al hacerlo, se produce una mayor expresión génica del receptor. Por lo tanto, al aislar células T CD8⁺ del bazo de ratones *Klf10*^{-/-} se encontraron niveles más bajos de TGF β 2, lo cual sugiere que KLF10 tiene un papel fundamental en la activación transcripcional del gen *Tgf β 2* en células T CD8⁺.

ANTECEDENTES

M. tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis, la cual es una enfermedad principalmente pulmonar y, cuya progresión puede tener varios resultados, determinados en gran medida por la respuesta del sistema inmune del huésped (Smith, 2003). En la mayoría de los casos, la infección puede ser controlada gracias a mecanismos que involucran tanto a la respuesta inmune innata como a la respuesta inmune adaptativa, de esta manera, la bacteria puede ser reconocida, eliminada y/o confinada en granulomas.

Sin embargo, la micobacteria ha desarrollado estrategias para evadir las respuestas inmunes del hospedero, por ejemplo, evitando la maduración de los fagosomas, eludiendo la fusión fagosoma-lisosoma, promoviendo la secreción de citocinas antiinflamatorias como TGF β , que impide la proliferación de los linfocitos T y B, disminuye de la producción de IFN γ y participa en la desactivación de macrófago (Olobo et al., 2001).

Ahora bien, KLF10 es un factor transcripcional que fue identificado en osteoblastos fetales humanos como un gen inducible por TGF β , por la cual también es llamado TIEG1 (Subramaniam et al., 1995). Este factor transcripcional funciona como regulador de la transcripción de genes que participan principalmente en la proliferación celular y en la inducción de la apoptosis, por lo tanto, tiene un papel importante en múltiples procesos biológicos y estados patológicos. Recientemente se describió la inducción de *Klf10* en respuesta a una infección con *M. tuberculosis* en macrófagos broncoalveolares de ratón (Madrid-Paulino et al., 2022).

La ausencia del gen *Klf10* incrementa la activación proinflamatoria de los macrófagos, lo cual se sugiere que es un represor transcripcional clave de citocinas inflamatorias en macrófagos (Zhang et al., 2013; Papadakis et al., 2015). De acuerdo con esto, en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos deficientes del gen *Klf10* producen mayores niveles de citocinas inflamatorias y menores niveles de citocinas antiinflamatorias que los macrófagos silvestres (Madrid et al., 2022).

Así mismo, KLF10 participa en la regulación de genes diana de TGF β y unirse a las regiones promotoras de genes que codifican componentes de la vía de señalización de TGF β , regulando así la duración e intensidad de la respuesta de TGF β y originando estado de retroalimentación positiva (Spittau & Krieglstein, 2011).

Dado que: i) la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del macrófago depende de establecer un ambiente antiinflamatorio; ii) esta bacteria induce la producción de la citocina antiinflamatoria TGF β , que a su vez regula la expresión de *Klf10*; y iii) este factor de transcripcional atenúa la producción de citocinas proinflamatorias, este trabajo busca dilucidar si a través de TGF β , *M. tuberculosis* induce la expresión de *Klf10* en macrófagos murinos para impedir una respuesta inflamatoria y promover su sobrevivencia.

HIPÓTESIS

TGF β induce la expresión del factor transcripcional *Klf10* en respuesta a la infección de macrófagos murinos con *M. tuberculosis*.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar si la expresión de *Klf10* en respuesta a la infección de macrófagos murinos con *M. tuberculosis* se debe a la presencia de TGF β .

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si *M. tuberculosis* induce la expresión de *Klf10*.
- Evaluar si *M. tuberculosis* induce la expresión de *Tgf β 2*.
- Evaluar si *M. tuberculosis* induce la expresión de *Tgf β 1* y la producción proteica TGF β .
- Determinar si la expresión de *Klf10* depende de TGF β en una infección por *M. tuberculosis*.

METODOLOGÍA

Línea celular L929

Se cultivaron células de la línea celular L929 (fibroblastos de ratón) productoras de M-CSF (Macrophage colony stimulating factors) en medio DMEM (GIBCO-Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 10% (subproductos FBS), penicilina (100 µg/mL) - estreptomycin (100 µg / mL) (GIBCO-Invitrogen) y glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂. Para generar el medio condicionado L929, el cual sirve para diferenciar macrófagos derivados de médula ósea, se sembraron 5x10⁵ células en un matraz de 75 cm² con 30 mL de medio DMEM suplementado durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se recolectó el medio condicionado (sobrenadante), se filtró con un filtro de 0,22 µm y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)

Todos los procedimientos de manipulación de animales que se describen a continuación fueron aprobados previamente en la autorización número 284 expedida por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (UNAM).

Se sacrificaron ratones BALB/c WT de 8 a 10 semanas de edad de los cuales se obtuvieron los fémures al diseccionar ambas patas y separar los músculos de los huesos y, una vez realizado esto, los fémures se colocaron en un tubo falcón de 15 mL con PBS 1X estéril. Bajo condiciones controladas de esterilidad, se colocaron los huesos en etanol al 70% por 1 minuto, se retiraron ambas epífisis y se enjuagaron los huesos con PBS 1X estéril contenido en una jeringa estéril de 1 mL acoplada a una aguja de jeringa de tuberculina para extraer la médula ósea en un tubo de polipropileno de 50 mL. Las células fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en medio de diferenciación. Se sembraron 5x10⁶ células en una placa de Petri de plástico con baja adherencia junto con 10 mL de medio de diferenciación y se incubaron a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂.

El medio de diferenciación estaba compuesto por 70% de medio DMEM (GIBCO-Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 10% (subproductos FBS), penicilina (100 µg/mL) - estreptomycin (100 µg / mL) (GIBCO-Invitrogen), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) y 30% de medio condicionado proveniente de la línea celular L929, el cual funciona como factor de crecimiento de estimulación de colonias de macrófagos.

Cuarenta y ocho horas después de la siembra, se descartaron 5 mL del medio contenido en la placa de Petri y se reemplazaron con 5 mL de medio de diferenciación fresco, este paso se repitió 48 horas después. Al día 7 se descartó todo el medio de la placa de Petri, las células se lavaron con PBS 1X estéril, se separaron de la superficie de la placa de Petri pipeteando suavemente por toda la caja y se colocaron en un tubo falcón de 15 mL (Figura suplementaria 1).

Enseguida se procedió a contabilizar los BMDMs, para ello se tomó una alícuota de 1 mL del tubo falcón que contenía a las células previamente resuspendidas y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Esta alícuota se resuspendió y se tomó otra alícuota de 20 μ L, la cual se puso en un tubo eppendorf de 0.6 mL junto con 20 μ L de azul de tripano. Se mezclaron ambos volúmenes perfectamente, se tomaron 10 μ L que fueron colocados en la cámara de Neubauer y se procedió a contabilizar las células de los cuatro cuadrantes. Una vez obtenido el número de células en la cámara Neubauer, se aplicó la siguiente fórmula para conocer el número total de células presentes en el tubo falcón inicial:

$$\text{Número total de células} = \left(\frac{(\text{Total de células contadas}) (2)}{4} \right) (10,000) (\text{Número de mL totales})$$

Posteriormente se centrifugaron las células contenidas en el tubo falcon de 15 mL a 1200 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10% (subproductos FBS), penicilina (100 μ g/mL) - estreptomycin (100 μ g/mL) (GIBCO-Invitrogen), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) y β -mercaptoetanol (50 μ M) y se colocó el volumen necesario para tener 1×10^6 células en cada placa de Petri de 35 mm. Los BMDMs fueron incubados una noche antes del procedimiento experimental a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂.

Cepa H37Ra de *M. tuberculosis*

Las alícuotas de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* usadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Rogelio Hernández Pando (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán").

Históricamente, la cepa H37Ra es una cepa no virulenta que deriva de bacilos envejecidos de la cepa virulenta H37 y se ha usado como referencia para estudiar la virulencia y la patogenia de *M. tuberculosis*; en comparación con su contraparte virulenta (cepa H37Rv) presenta características diferenciales como una morfología de colonia elevada, una disminución de la supervivencia en condiciones anaeróbicas o dentro de los macrófagos, una alteración de la capacidad para romper las membranas fagosomales y una pérdida de virulencia en cobayos y ratones (Zheng et al., 2008).

Infección de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*

Dado que la infección de los BMDMs se llevó a cabo a una MOI de 5:1, es decir 5 bacterias por cada macrófago, y en cada placa de Petri había 1×10^6 macrófagos, se usaron 5×10^6 bacterias para infectar cada placa. Inicialmente se descongelaron alícuotas de la cepa de H37Ra de *M. tuberculosis*, éstas se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. En condiciones de esterilidad, se descartó el sobrenadante procurando no desechar el pellet, se añadió medio RPMI sin suplementar y se disgregó el pellet al vortexear vigorosamente durante 3 minutos (medio de infección).

Se descartó el medio de los BMDMs previamente incubados, se realizó un lavado con PBS 1X estéril y se colocó el volumen necesario de medio de infección para infectar a una MOI de 5:1. Los BMDMs se incubaron durante 1 hora a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados a las células, uno con PBS 1X estéril + penicilina (100 µg/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (GIBCO-Invitrogen) y otro con PBS 1X estéril, después se añadió medio RPMI (GIBCO-Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10% (subproductos FBS), penicilina (100 µg/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (GIBCO-Invitrogen), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) y β-mercaptoetanol (50 µM). Se incubaron las células a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂ durante 30 minutos, 1, 2, 4, y 12 horas, respectivamente. Finalmente se descartó el medio, se realizó un lavado con PBS 1X estéril y se procedió a realizar la extracción de RNA.

Extracción de RNA

El RNA total se aisló de los BMDMs infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* usando TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, 15596026) siguiendo las instrucciones del fabricante, las cuales se dividen en 5 partes:

a. Homogeneización

Se añadieron 200 µL de TRIzol a cada placa de Petri, la cual contenía a las células experimentales y se procedió a realizar un raspado de la superficie de la placa de Petri hasta que el TRIzol adquirió una consistencia viscosa. El volumen se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

b. Separación de fases

Se incubaron las muestras homogeneizadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas, se agregaron 40 µL de cloroformo y se vortexeó vigorosamente la muestra hasta adquirir un aspecto lechoso y homogéneo. Nuevamente se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron las muestras a 14.000 rcf durante 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, la muestra se separó en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior, la cual se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL.

c. Precipitación de RNA

Se añadieron 100 µL de isopropanol a cada uno de los tubos que contenían la fase acuosa superior y se vortexeó brevemente para mezclar. Se incubó a 4°C durante 1 hora y, una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 18 000 rcf durante 10 minutos a 4°C.

d. Lavado de RNA

Se retiró el sobrenadante, se añadió 250 µL de etanol al 100% y se centrifugaron las muestras a 18.000 rcf durante 5 minutos a 4°C. Nuevamente se retiró el sobrenadante, se agregaron 250 µL de etanol al 70% y se centrifugó la muestra de nueva cuenta a 18.000 rcf durante 5 minutos a 4°C.

e. Resuspensión de RNA

Se retiró el sobrenadante con la micropipeta de 1000 µL, luego se centrifugaron las muestras a 18.000 rcf durante 2 minutos a 4°C. Nuevamente se retiró el sobrenadante con la micropipeta de 200 µL, se destaparon todos los tubos y se

permitió la evaporación de los restos de alcohol de la muestra durante 3 minutos. Se disolvió el pellet de RNA en 21 μL de agua libre de RNAsas (o agua DEPC) resuspendiendo la solución varias veces por las paredes del tubo eppendorf. Se tomó 1 μL de cada una de las muestras para su lectura en el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y, así, determinar la concentración de RNA y pureza de la muestra, esta última variable se estableció mediante la relación 260/280 y la relación 260/230.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel desnaturizante para evaluar visualmente la calidad del RNA extraído de las muestras. El fundamento de este tipo de electroforesis es usar un reactivo tóxico, como hipoclorito de sodio al 6 % (blanqueador comercial) para interrumpir la estructura secundaria del RNA, lo que permite observar las bandas de RNA ribosómico 28S y 18S después de realizar una electroforesis horizontal en gel de agarosa; así mismo, al usar este reactivo se protege al RNA de la degradación por RNAsas durante la electroforesis. Para analizar la calidad del RNA de nuestras muestras se siguió el protocolo descrito en el trabajo de Aranda y colaboradores (2012):

- Preparación del gel desnaturizante

En un matraz se añadieron 50 mL de buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X y 0.5 g de agarosa para elaborar un gel de agarosa al 1%. Esta mezcla se calentó y agitó hasta su homogenización y se dejó enfriar por algunos minutos; una vez ocurrido esto se añadieron 500 μL de hipoclorito de sodio al 6 % (blanqueador comercial), de esta forma nuestro gel tuvo una concentración final de blanqueador igual al 1% (v/v). Posteriormente se vertió la mezcla en un molde y se permitió su solidificación.

- Carga y corrida de las muestras

Se tomaron 500 ng de cada muestra de RNA, los cuales se mezclaron con loading buffer para DNA 10X (xileno cianol 1.9 mM, azul de bromofenol 1.5 mM, 25 % de glicerol en dH_2O estéril) (Sigma-Aldrich), y se llevó a cabo una electroforesis en gel horizontal en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X a 120V durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10mg/mL) durante 5 minutos y se reveló en un transiluminador UV (Figura suplementaria 3).

Finalmente, se todas las muestras se llevaron a una concentración final de 100 ng/ μL añadiendo el volumen necesario de agua DEPC.

Transcripción inversa

Para la transcripción inversa se tomaron 500 ng de RNA total de cada muestra y se añadió el volumen necesario de agua destilada estéril para tener un volumen igual a 12.5 mL. Posteriormente se añadió 1 mL de dNTPs (10mM) y 1 mL de oligo dT (100 pmol) y 1 mL de random hexamers (100 pmol); esta mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos en el termociclador. Transcurrido el tiempo, la reacción fue colocada en hielo durante 2 minutos y se añadieron: i) 4 μL de RT buffer 5X, ii) 0.5 μL de la enzima REVERTAID RT y, iii) 4.5 μL de agua destilada estéril para tener un volumen final igual a 20 μL . Luego se programó el termociclador de la siguiente forma:

- a. 25°C por 10 minutos
- b. 42°C por 60 minutos

c. 70°C por 10 minutos

Una vez que finalizado el programa, se transfirió el volumen de la reacción a un tubo eppendorf de 1.5 mL junto con 180 mL de agua destilada estéril para tener un volumen final de 200 mL de cDNA, el cual se resguardó a -20°C hasta su uso.

Diseño de primers para qPCR

Los primers son secuencias cortas de DNA de una sola cadena que establecen la especificidad de la secuencia a amplificarse (gen de interés) cuando se realiza una PCR. Los genes que fueron el objeto de estudio en este trabajo y para los cuales se diseñaron primers fueron *Actb*, *Klf10*, *Tgfβ* y *Tgfβr2*. Cada uno de estos genes se buscó Ensembl (<https://www.ensembl.org>) especificando la especie (ratón) y la cepa (BALB/c) del genoma de referencia para analizar dicho gen. A partir del mapa de exones de cada gen, se seleccionaron los dos exones que se encuentran más alejados entre sí y se copiaron sus secuencias en Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>). Esta interfaz web permite el diseño de primers a partir de una secuencia dada, además, se puede configurar el tamaño del producto, la Tm y el % GC deseados. Se tomó uno de los pares de primers que Primer3Plus diseñó y llevó a cabo su validación en Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para verificar su especificidad en un genoma de referencia (ratón).

A continuación, se describen los primers diseñados para los genes que fueron objeto de estudio en el presente trabajo:

Organismo	Gen	Tipo	Secuencia	Tm	Exon	ID del transcrito	Tamaño del amplicon	Eficiencia
Ratón	<i>Actb</i>	Forward	CTAAGGCCAA CCGTGAAAAG	63.8	3	ENSMUST0000 0100497.10	125	96.6%
		Reverse	CATCACAATGC CTGTGGTAC	62	4			
	<i>Klf10</i>	Forward	CTTCTCTCCAG CAAGCTTCG	64.7	1	ENSMUST0000 0074043.7	90	95.3%
		Reverse	TCTGCTCAGCT TTGTCCCA	65.3	2			
	<i>Tgfβ1</i>	Forward	GCGGACTACT ATGCTAAAGA GG	61.2	1	ENSMUST0000 0002678.10	122	106.4%
		Reverse	CGAATGTCTG ACGTATTGAAG	60.3	2			
	<i>Tgfβr2</i>	Forward	GGAACGGCA AGATACAT	60.5	5	ENSMUST0000 0035014.8	160	91%
		Reverse	GGGCTCGTAA TCCTTCAC	60.2	6			

qPCR

Para la qPCR se usó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, K0221) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se preparó la mezcla maestra usando para cada muestra 5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Máster Mix (2X), 0.5 μ L del mix de primers (0.5 mM) forward/reverse del gen a analizar y 3.5 μ L de agua destilada estéril. Posteriormente se sirvió la mezcla maestra a tubos para PCR (0.1 mL) y se añadió 1 μ L del cDNA (diluído 1:10 de la reacción final de transcripción inversa) de cada una de las muestras, respectivamente. Después se centrifugaron las placas por algunos segundos para llevar todo el volumen de la reacción al fondo de los tubos y se colocaron en el equipo StepOne Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, 4376357). El termociclador siguió el siguiente programa:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Alineamiento	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	

La adquisición de los datos se llevó a cabo una vez terminada el paso de extensión.

ELISA

Para medir los niveles de TGF β 1 secretados por los macrófagos expuestos a la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) se usaron kits de ELISA para TGF β 1 tipo sándwich (Thermo Fisher Scientific, #88-8350), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para empezar, se colocaron 100 μ L del anticuerpo de captura (1:250) en una microplaca para ELISA de 96 pozos y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron 3 lavados con 200 μ L de buffer de lavado (PBS 1X, 0.05% Tween) y se bloquearon los pozos incubando durante 1 hora temperatura ambiente con 200 μ L de de diluyente ELISA (1:5).

Mientras transcurría este tiempo se descongelaron los sobrenadantes de 1×10^6 BMDMs tratados con el vehículo (control) o expuestos a la bacteria durante 1, 2, 4 y 12 horas, respectivamente; por otra parte, se realizó la curva estándar de la proteína TGF β 1 recombinante realizando diluciones seriadas. Es importante mencionar que para activar el TGF β 1 latente a la forma inmunorreactiva las muestras deben acidificarse y luego neutralizarse; por ello se tomaron 100 μ L de cada uno de los sobrenadantes y se agregaron 20 μ L de HCl 1N, esto se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego las muestras se neutralizaron con 20 μ L de NaOH 1N.

Una vez concluido el tiempo de bloqueo de los pozos de la microplaca de ELISA se realizaron 3 lavados con 200 μ L de buffer de lavado (PBS 1X, 0.05% Tween), se sirvieron 100 μ L de la curva estándar por duplicado y 100 μ L de cada una de las muestras previamente acidificadas y neutralizadas y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Después se hicieron 5 lavados con 200 μ L de buffer de lavado (PBS 1X, 0.05% Tween), se adicionaron 100 μ L del anticuerpo de detección (1:250) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron nuevamente 5 lavados con 200 μ L de buffer de lavado (PBS 1X, 0.05% Tween), se añadieron 100 μ L de Avidina-HRP y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 5 lavados con 200 μ L de buffer de lavado (PBS 1X, 0.05% Tween), se agregaron 100 μ L de TMB 1X y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Una vez pasado el tiempo, se añadieron 100 μ L de Solución Stop (ácido sulfúrico 2 M) y se procedió a leer la placa a 450 nm en el espectrofotómetro.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos de los diferentes experimentos fueron reportados como medias \pm desviación estándar. La comparación de los datos experimentales se realizó en el software estadístico GraphPad Prism 9 mediante el análisis de ANOVA de una vía y pruebas *post hoc* de Dunnett, la significancia estadística se definió como *P<0.05, **<P 0.01 y ***P< 0.001.

RESULTADOS

La expresión de *Klf10* incrementa en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) cuando son infectados con *M. tuberculosis*

Previamente en el laboratorio se observó que los niveles del mensajero de *Klf10* aumentan en la línea celular de macrófagos alveolares de ratones MH-S infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 10:1) (Madrid-Paulino et al., 2022). Dada esta evidencia, confirmamos este dato usando BMDMs infectados con la misma cepa de *M. tuberculosis* (MOI 5:1). Se encontró que a los 30 minutos post infección los niveles del mensajero de *Klf10* son similares al tratamiento control; sin embargo, a la hora post infección los niveles de mRNA de *Klf10* aumentan significativamente y se mantienen así hasta las 2 horas post infección (Fig. 10). Finalmente, los niveles del mRNA de *Klf10* comienza a disminuir a las 4 y 12 horas post infección y los niveles son parecidos a los encontrados en los macrófagos no infectados (Fig. 10).

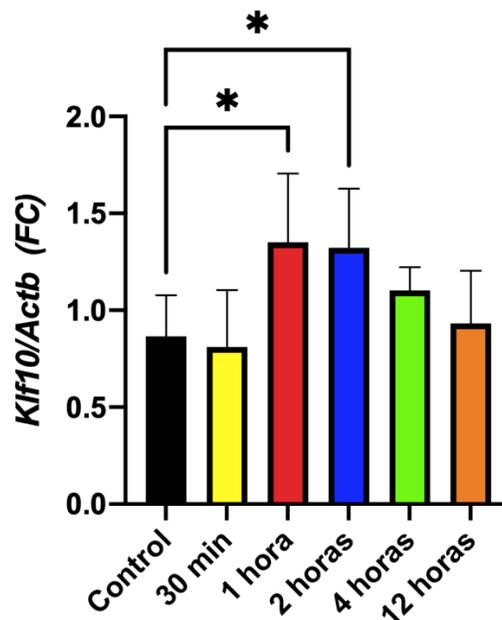


Figura 10. *M. tuberculosis* induce la expresión de *Klf10* en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) a tiempos cortos post infección. Se infectaron 1×10^6 BMDMs con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) durante 1 hora, transcurrido este tiempo se descartó la micobacteria, se añadió medio RPMI suplementado fresco y se cultivaron las células durante 30 minutos, 1, 2, 4, y 12 horas, respectivamente, como control se usaron células tratadas únicamente con el vehículo. Posteriormente se extrajo RNA de las células, se realizó una transcripción reversa y por medio de qPCR se determinaron los niveles del transcrito *Klf10* en cada tratamiento. Se grafica la media \pm la desviación estándar (n=3) del enriquecimiento relativo (fold change, FC) de *Klf10* con respecto a *Actb* en cada tratamiento. * P<0.05 (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett)

Este dato confirma que *M. tuberculosis* promueve la expresión del gen *Klf10* en BMDMs a partir de la hora post infección.

La expresión de *Klf10* incrementa en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) al tratarlos con TGFβ exógeno a tiempos cortos

Dado los resultados anteriores, y que la expresión del gen *Klf10* es regulado por TGFβ (Subramaniam et al., 1995), evaluamos si TGFβ regula los niveles del mRNA de *Klf10* en BMDMs. Para ello se realizaron cultivos celulares con la presencia de la proteína recombinante TGFβ1 a una concentración de 10 ng/mL durante 1, 2, 4 y 12 horas respectivamente. Se encontró que los cultivos celulares expuestos durante 1 hora a TGFβ1 presentan mayores niveles del mensajero *Klf10* en comparación al tratamiento control. Así mismo, conforme transcurre el tiempo, los niveles del mensajero de *Klf10* disminuyen en los cultivos celulares tratados con TGFβ1, de tal forma que a las 12 horas los niveles de *Klf10* son equivalentes a los del tratamiento control (Fig. 11).

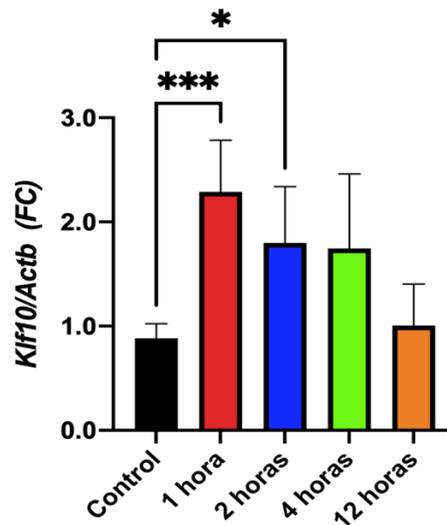


Figura 11. TGFβ1 induce la expresión de *Klf10* en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) a tiempos cortos post tratamiento. Se cultivaron 1×10^6 BMDMs en presencia de la proteína recombinante TGFβ1 (10 ng/mL) durante 1, 2, 4 y 12 horas respectivamente, como control se usaron células tratadas únicamente con el vehículo. Posteriormente se extrajo RNA de las células, se realizó una transcripción reversa y por medio de qPCR se determinaron los niveles del transcrito *Klf10* en cada tratamiento. Se grafica la media \pm la desviación estándar ($n=3$) del enriquecimiento relativo (fold change, FC) de *Klf10* con respecto a *Actb* en cada tratamiento. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett)

Estos datos indican que TGFβ1 incrementa los niveles de *Klf10* en cultivos de BMDMs a tiempos cortos de exposición, así mismo, confirman el hallazgo de Subramaniam y colaboradores (1995) y nos demuestra la razón por la cual el gen KLF10 fue inicialmente llamado TIEG (TGFβ inducible early gene, por sus siglas en inglés).

La expresión de *Tgfβr2* aumenta en respuesta a una infección con *M. tuberculosis*

Una vez que dilucidamos experimentalmente que tanto la micobacteria como TGFβ1 inducen la expresión de *Klf10*, y teniendo en cuenta que la vía de señalización de TGFβ es iniciada por la unión de TGFβ al receptor TGFβR2, se probó si *M. tuberculosis* inducía la expresión del mensajero *Tgfβr2* en BMDMs. Se

encontró que a tiempos cortos post infección (30 minutos - 1 hora) no hay diferencias significativas en la expresión de *Tgfβ2* entre macrófagos con o sin estímulo de la micobacteria; sin embargo, a las 2 y a las 4 horas post infección la expresión de *Tgfβ2* incrementa 7 y 12 veces, respectivamente, sobre los niveles basales (macrófagos no infectados). A las 12 horas post infección los niveles de *Tgfβ2* son equivalentes a los del tratamiento control (Fig. 12).

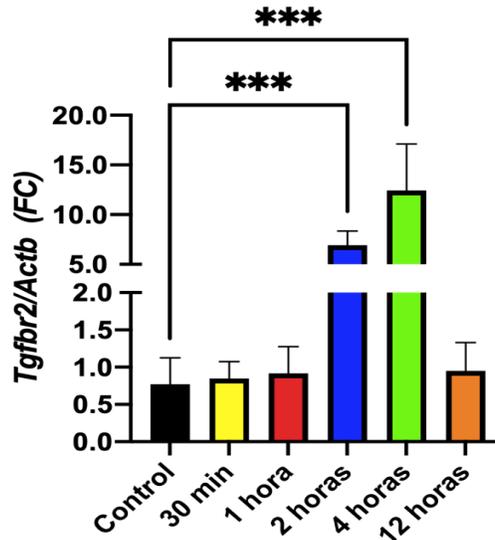


Figura 12. *M. tuberculosis* induce la expresión de *Tgfβ2* en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) a partir de las 2 horas post infección. Se infectaron 1×10^6 BMDMs con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) durante 1 hora, transcurrido este tiempo se descartó la micobacteria, se añadió medio RPMI suplementado fresco y se cultivaron las células durante 30 minutos, 1, 2, 4, y 12 horas, respectivamente, como control se usaron células tratadas únicamente con el vehículo. Posteriormente se extrajo RNA de las células, se realizó una transcripción reversa y por medio de qPCR se determinaron los niveles del transcrito *Tgfβ2* en cada tratamiento. Se grafica la media \pm la desviación estándar ($n=3$) del enriquecimiento relativo (fold change, FC) de *Tgfβ2* con respecto a *Actb* en cada tratamiento. *** $P < 0.001$ (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett).

Esto nos indica que la infección de BMDMs con *M. tuberculosis* aumentan la expresión de *Tgfβ2* a partir de las 2 horas postinfección.

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) tratados con *M. tuberculosis* presentan una disminución en la expresión de *Tgfβ1* y no exhiben un cambio en sus niveles proteicos de TGFβ1 a tiempos cortos postinfección

Dado que, por un lado, TGFβ induce la expresión de *Klf10* y por el otro, *M. tuberculosis* induce la expresión de *Tgfβ2* en BMDMs, evaluamos si la infección de BMDMs con la micobacteria también regula la expresión de *Tgfβ* y la producción de la proteína TGFβ. Para esto, se determinaron los niveles del mensajero *Tgfβ1* y de la proteína TGFβ1 en BMDMs infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1). A nivel de mensajero, contrario a lo esperado, se encontró una disminución significativa del mensajero en tiempos cortos post infección (1 hora - 2 horas) y, conforme transcurre el tiempo, los niveles del mensajero aumentan hasta ser equivalentes a los niveles basales observados en macrófagos no infectados con

la micobacteria (Fig. 13A). Congruente con esto, a nivel de proteína, la concentración de TGFβ1 en el sobrenadante de cultivo de macrófagos infectados, independientemente del tiempo de infección, no presenta diferencias estadísticamente significativas con los niveles observados en el sobrenadante de macrófagos no infectados (Fig.13B).

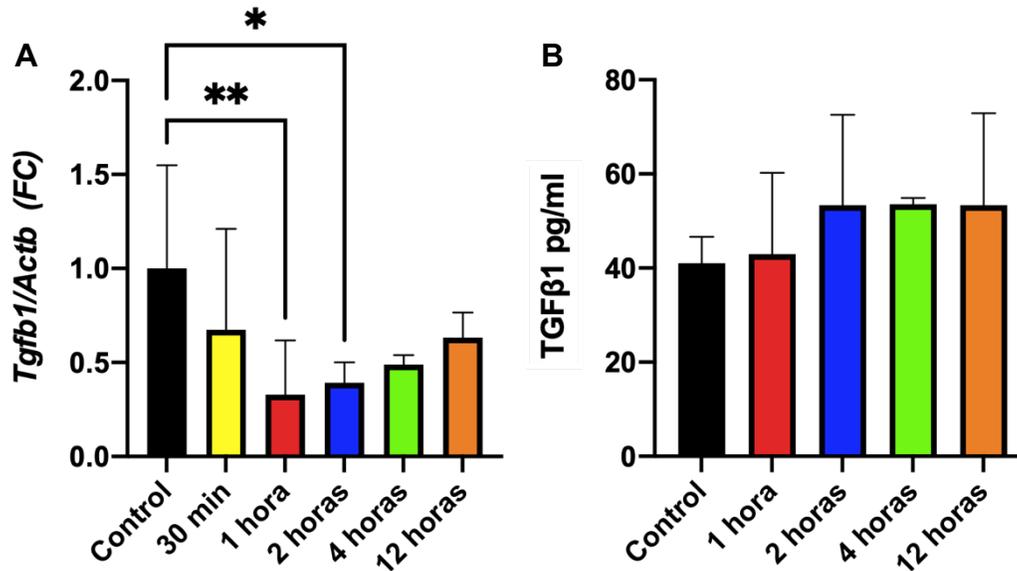


Figura 13. *M. tuberculosis* disminuye los niveles del transcrito *Tgfβ1* y no cambia los niveles proteicos de TGFβ1 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs). A) Niveles del transcrito *Tgfβ1* a distintos tiempos post infección con *M. tuberculosis*. Se infectaron 1×10^6 BMDMs con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) durante 1 hora, transcurrido este tiempo se descartó la micobacteria, se añadió medio RPMI suplementado fresco y se cultivaron las células durante 30 minutos, 1, 2, 4, y 12 horas, respectivamente, como control se usaron células tratadas únicamente con el vehículo. Posteriormente se extrajo RNA de las células, se realizó una transcripción reversa y por medio de qPCR se determinaron los niveles del transcrito *Tgfβ* en cada tratamiento. Se grafica la media \pm la desviación estándar (n=3) del enriquecimiento relativo de *Tgfβ1* con respecto a *Actb* en cada tratamiento. *P<0.05 **<P 0.01 (ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Dunnett). B) Niveles proteicos de TGFβ1 a distintos tiempos post infección con *M. tuberculosis*. Se infectaron 1×10^6 BMDMs con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) durante 1 hora, transcurrido este tiempo se descartó la micobacteria, se añadió medio RPMI suplementado fresco y se cultivaron las células durante 30 minutos, 1, 2, 4, y 12 horas, respectivamente, como control se usaron células tratadas únicamente con el vehículo. Se colectaron los sobrenadantes de cada uno de los tratamientos y se determinaron los niveles proteicos con kits de ELISA para TGFβ1 tipo sándwich. Se grafica la media \pm la desviación estándar (n=3) de la concentración (pg/mL).

Estos datos sugieren que, a pesar de que la infección de BMDMs con *M. tuberculosis* resulta en la expresión del receptor 2 de TGFβ (*Tgfbr2*), en los tiempos evaluados la expresión de *Klf10* inducida por la micobacteria no involucra a TGFβ ya que la infección de los macrófagos con *M. tuberculosis* a los tiempos que hay una clara inducción de la expresión del gen *Klf10*, no se induce la expresión del mRNA de *Tgfb* ni incrementa los niveles proteicos de TGFβ.

Para determinar si los niveles basales de TGFβ observados en los sobrenadantes de los macrófagos tienen alguna influencia en los niveles del mensajero *Klf10*, se examinó, de forma preliminar, si existe un cambio en el comportamiento de la

expresión de *Klf10* al agregar un anticuerpo bloqueante de TGF β 1. Los niveles de expresión de *Klf10* disminuyen a la mitad cuando se infectan BMDMs con la micobacteria y, luego, se tratan con un anticuerpo anti-TGF β 1 a una concentración de 10 ng/mL durante 4 horas (Fig. 14).

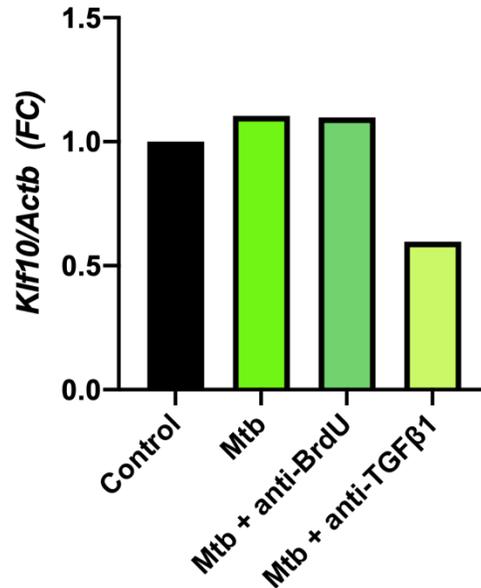


Figura 14. Los niveles basales de TGF β en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) son necesarios para la expresión del mensajero *Klf10* cuando hay una infección con *M. tuberculosis*. Se infectaron 1×10^6 BMDMs con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) durante 1 hora, transcurrido este tiempo se descartó la micobacteria, se añadió medio RPMI suplementado fresco + anticuerpos anti-BrdU (tratamiento inespecífico) o anticuerpos anti-TGF β 1 a una concentración de 10 ng/mL y se cultivaron las células durante 4 horas, como control se usaron células tratadas únicamente con el vehículo. Posteriormente se extrajo RNA de las células, se realizó una transcripción reversa y por medio de qPCR se determinaron los niveles del transcrito *Klf10* en cada tratamiento. Se grafica la media del enriquecimiento relativo (fold change, FC) de *Klf10* con respecto a *Actb* en cada tratamiento (n=1).

En estos datos sugieren, preliminarmente, que los niveles basales de TGF β 1 en cultivos de BMDMs infectados con *M. tuberculosis* es necesaria para mantener los niveles del mensajero *Klf10*

Así, en conjunto nuestros datos indican que, en los tiempos evaluados, la expresión de *Klf10* inducida por *M. tuberculosis* durante la infección de BMDMs es mediada a través de un mecanismo independiente TGF β . Sin embargo, la presencia de TGF β basal en los macrófagos es necesaria para promover la expresión del mensajero de *Klf10*.

DISCUSIÓN

M. tuberculosis es una bacteria patógena catalogada como el agente etiológico de la tuberculosis. Aunque existen distintos tratamientos y vacunas para contender con esta enfermedad, se estima que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*. Sin embargo, es importante mencionar que las probabilidades de desarrollar tuberculosis activa dependen de factores como: i) el ambiente, ii) el sistema inmune del hospedero y, iii) los mecanismos de resistencia y factores de virulencia de la bacteria. Por lo anterior, sólo una proporción relativamente pequeña (5-10%) de la población infectada por *M. tuberculosis* presenta una tuberculosis activa y sus consecuentes complicaciones (Nicol & Wilkinson, 2008; OMS, 2021).

La infección por *M. tuberculosis* comienza cuando se inhalan aerosoles contaminados con la bacteria, los cuales llegan a la zona alveolar del pulmón donde la bacteria interacciona con distintos tipos celulares, principalmente con macrófagos y células dendríticas, los cuales participan en la destrucción de *M. tuberculosis* mediante fagocitosis o, bien, en el aislamiento de la bacteria en granulomas. No obstante, algunos bacilos pueden escapar de este ambiente, y permanecer libres en el pulmón y/o diseminarse a otros órganos del cuerpo; esto se debe a que *M. tuberculosis* ha desarrollado mecanismos para evitar su destrucción evadiendo las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Pieters, 2008).

Es importante mencionar que la supervivencia de la micobacteria depende del establecimiento de un ambiente antiinflamatorio, el cual desactiva a los macrófagos e impide la proliferación de los linfocitos T y B. Para lograr esto se necesita de la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IFN γ y TNF) y del incremento de la expresión de citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL10 y TGF β) (Olobo et al., 2001; O'Leary et al., 2011; Villaseñor et al., 2019).

En el caso particular de TGF β , se han realizado distintos estudios que confirman su expresión y su participación en la inmunopatogénesis en sitios de infección por *M. tuberculosis* (Toossi y Ellner, 1998; Olobo et al., 2001; Gong et al., 2012). Así mismo, TGF β puede inducir la expresión de *KLF10*, un factor transcripcional identificado en osteoblastos fetales humanos que regula la expresión génica en distintos procesos celulares (por ejemplo, la apoptosis, la proliferación, la diferenciación y la inflamación) (Subramaniam et al., 1995; Cao et al., 2009; Biology et al., 2016). Hablando particularmente de procesos inflamatorios, *KLF10* juega un papel importante en la diferenciación de los macrófagos intestinales hacia un fenotipo antiinflamatorio que contribuye a la regulación de la colitis *in vivo* (Cao et al., 2010). Esto sugiere que *KLF10* es un represor transcripcional de citocinas inflamatorias en macrófagos (Zhang et al., 2013). Recientemente se reportó que *KLF10* tiene una importante función en la destrucción de *M. tuberculosis* (Madrid-Paulino et al., 2022), dado que los macrófagos deficientes de *Klf10* producen más IFN γ tras la estimulación con la micobacteria, lo cual mejora la captación bacteriana y la actividad bactericida mediante macropinocitosis.

En el presente trabajo buscamos dilucidar si a través de TGF β *M. tuberculosis* induce la expresión del factor transcripcional *Klf10* en macrófagos murinos para impedir una respuesta inflamatoria y promover su sobrevivencia.

De acuerdo con el hecho de que el gen *KLF10* fue inicialmente llamado TIEG (TGF β inducible early gene, por sus siglas en inglés) por ser inducido de manera temprana en respuesta a TGF β en osteoblastos fetales humanos (Subramaniam et al., 1995), encontramos que los cultivos de BMDMs expuestos a TGF β 1 recombinante durante 1 hora incrementan 2 veces los niveles de mensajero de *Klf10* sobre los niveles basales (Figura 11). Esto también es congruente con distintos estudios que han demostrado que KLF10 actúa como una molécula antiinflamatoria (Papadakis et al., 2015; Biology et al., 2016) y que, en macrófagos, en cultivo, estimulados con TGF β recombinante el nivel de los transcritos de moléculas antiinflamatorias como IL10 incrementa (Zhang et al., 2016).

Ahora bien, Madrid-Paulino y colaboradores (2022) observaron que los macrófagos alveolares de ratones MH-S infectados con la cepa no patógena de *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) los niveles de mRNA de *Klf10* incrementan 2 veces, con respecto a los niveles observados en macrófagos no infectados. En el presente trabajo corroboramos este dato usando la misma cepa de la micobacteria (MOI 5:1) y macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs); hallamos que los niveles del mensajero *Klf10* aumentan 1.6 veces después de 1 y 2 horas post infección en aquellos macrófagos que fueron infectados con la micobacteria (Figura 10). Ambos datos indican que la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* induce la expresión de *Klf10* en macrófagos tras la infección con la micobacteria. Así mismo, podemos atribuir que los niveles de expresión de *Klf10* son menores en nuestros datos ya que usamos una MOI menor que la de Madrid-Paulino y colaboradores (2022).

Haciendo una comparación entre las cinéticas de expresión de *Klf10* en BMDMs tratados con TGF β 1 recombinante (10 ng/mL), o bien, infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) podemos destacar que los niveles del mensajero de *Klf10* son mayores con el tratamiento con TGF β 1 recombinante. Sin embargo, el comportamiento de la expresión de *Klf10* en ambas cinéticas es similar, ya que el mensajero *Klf10* alcanza su pico de expresión a la hora del tratamiento con la proteína recombinante, o bien, a la hora post infección con la micobacteria. Posterior a ello los niveles de expresión disminuyen hasta que a las 12 horas la expresión de *Klf10* es equiparable con el tratamiento control en ambas cinéticas.

En 1995, Subramaniam y colaboradores descubrieron en osteoblastos fetales humanos que uno de los genes diana de la vía de señalización por TGF β era *KLF10*, por lo tanto, resulta interesante conocer si en un contexto de infección de macrófagos murinos por *M. tuberculosis* la expresión de *Klf10* en respuesta a *M. tuberculosis* se debe a la presencia de TGF β . La señalización por TGF β , en general, es iniciada por el reconocimiento de alguno de los miembros de la superfamilia de TGF β , los cuales se subdividen en: i) las tres isoformas de TGF β (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3), ii) las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y, iii) las activinas (Licon-Limón & Soldevila, 2007). Estos miembros son reconocidos como dímeros por el

dominio extracelular del receptor TGF β R2 que cambia de conformación y fosforila, y consecuentemente, activa al receptor TGF β R1 que, a su vez, fosforila a Smad2 y Smad3 lo que permite la unión a Smad4 para formar complejos heteroméricos de Smad que ingresan al núcleo e inician la transcripción de genes (Vander Ark et al., 2018).

Dado que un paso crucial en la vía de señalización de TGF β es la unión de un ligando al receptor TGF β R2, en el presente trabajo evaluamos la expresión del mensajero *Tgf β 2* después de una infección por *M. tuberculosis*. Encontramos que BMDMs infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* (MOI 5:1) presentan una sobreexpresión de *Tgf β 2* (Figura 12), por lo cual concluimos que los macrófagos son capaces de reconocer ligandos de la vía de señalización de TGF β cuando son infectados con *M. tuberculosis*. Así mismo, Gong y colaboradores (2012) indican que la delección de *Tgf β 2* en los macrófagos inhibe su polarización hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2), entonces, dado que *M. tuberculosis* propicia un ambiente antiinflamatorio para promover su supervivencia, no es de extrañarse que el mensajero de esta molécula se sobreexpresen en respuesta a la micobacteria.

De acuerdo con Papadakis y colaboradores (2015), KLF10 puede unirse directamente al promotor de *Tgf β 2* en las células T CD8⁺, y al hacerlo, se produce una mayor expresión génica de este receptor. Esto podría indicar un sistema de regulación positiva, donde KLF10 promueve su expresión regulando la expresión de *Tgf β 2*, el cual es vital para iniciar a vía de señalización de TGF β . Sin embargo, en el contexto de una infección por *M. tuberculosis*, es necesario evaluar la producción de la proteína KLF10 usando un ensayo ELISA y, observando si KLF10 puede unirse al promotor de *Tgf β 2* mediante un ensayo de ChIP-Seq.

En el presente trabajo únicamente evaluamos a TGF β 1 como ligando de la señalización de TGF β , para ello medimos los niveles del mensajero de *Tgf β 1* y de la proteína TGF β 1 y encontramos que la infección por *M. tuberculosis* en BMDMs no induce la expresión del mRNA de *Tgf β 1* ni incrementa los niveles proteicos de TGF β durante las primeras 12 horas postinfección (Figura 13). Sin embargo, existen varios reportes donde describen un aumento de TGF β 1 a partir de las 24 horas en un contexto de infección por *M. tuberculosis*; por ejemplo, Toossi y colaboradores (1995) observan que la proteína TGF β 1 incrementa sus niveles en los sobrenadantes de monocitos después de ser estimulados con LPS, o bien, tratados con derivado proteico purificado de *M. tuberculosis* durante periodos de 24 y 72 horas. Así mismo, Olobo y colaboradores (2001) encontraron niveles mayores de TGF β en plasma y fluido pleural de pacientes con tuberculosis. Por último, en el laboratorio, Madrid-Paulino (2023) también observó que después de 24 horas postinfección los sobrenadantes de cultivo de BMDMs infectados con la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* o estimulados con LPS incrementaban al doble su cantidad de TGF β 1 a comparación de aquellas células que no fueron tratadas.

El aumento de TGF β en presencia de *M. tuberculosis* se ha asociado con la inmunopatogénesis de esta bacteria, debido a que TGF β regula a la baja la función efectora de macrófagos contra las micobacterias (Bermudez, 1993), acelera la

replicación bacteriana intracelular (Hirsch, 1994) y altera la producción y función de citocinas inflamatorias como TNF e $IFN\gamma$ (Gong et al., 2012; Werner et al., 2000). Dado que la presencia de TGF β 1 es observable a partir de las 24 horas postinfección con la micobacteria, nos hace sugerir que puede estar ocurriendo una regulación a nivel de secreción de la proteína. Nüchel y colaboradores (2018) describieron que la secreción de TGF β 1 está crucialmente relacionada con la autofagia en fibroblastos y macrófagos y, a su vez, la autofagia está involucrada en la eliminación de la micobacteria (Gutiérrez et al., 2004). Así mismo, existen diferentes reportes que indican que *M. tuberculosis* ha desarrollado mecanismos a través de los cuales inhibe la autofagia del hospedero para evitar su destrucción (Shin et al., 2010; Chen et al., 2015; Saini et al., 2016; Ge et al., 2022); entonces, *M. tuberculosis* al estar inhibiendo la autofagia también podría estar deteniendo la secreción de TGF β 1 en los macrófagos infectados con la micobacteria.

Ahora bien, de manera preliminar, nuestros resultados indican que la presencia de TGF β 1 en cultivos de BMDMs infectados con *M. tuberculosis* es necesaria para mantener los niveles del mensajero *Klf10*. Esto lo observamos al tratar a las células con un anticuerpo anti-TGF β 1 después de la infección con la micobacteria, donde se disminuyen a la mitad los niveles de expresión de *Klf10* (Figura 14). Por lo tanto, planteamos que, a pesar de que los niveles proteicos de TGF β 1 medidos a lo largo de distintos tiempos postinfección no cambian, son necesarios y suficientes para mantener la expresión basal del mensajero de *Klf10* a tiempos cortos postinfección. Sin embargo, para aseverar esta idea es necesario hacer más repeticiones de nuestro experimento preliminar, el cual se realizó a las 4 horas postinfección dado que en este punto se observó el pico máximo de expresión de *Tgfb2* y, vale la pena repetir este experimento cuando se observa el pico máximo de expresión de *Klf10*, es decir, a la hora postinfección.

Tomando en cuenta todos nuestros hallazgos, concluimos que, en los tiempos evaluados, no podemos atribuir que la sobreexpresión temprana de *Klf10* en una infección con *M. tuberculosis* se debe directamente a la señalización de TGF β mediante el ligando TGF β 1. Sin embargo, es importante mencionar que el TGF β que se encuentra de forma basal en los cultivos de macrófagos es necesario para promover la expresión del mensajero de *Klf10*. Por lo tanto, es importante continuar caracterizando otras alternativas mediante las cuales se pueda explicar la expresión de *Klf10* inducida por *M. tuberculosis* a tiempos tempranos durante la infección del macrófago.

Un mecanismo alternativo a través del cual se puede estar regulando a *Klf10* en una infección con *M. tuberculosis* en macrófagos puede dilucidarse a partir de los siguientes hechos:

1. Es bien conocido que *M. tuberculosis* posee una alta capacidad de síntesis de cAMP dado que en su genoma se ha observado la presencia de múltiples parálogos de adenilato ciclasa (Agarwal & Bishai, 2009), así mismo, en un contexto de infección con *M. tuberculosis* en macrófagos, Bai et al. (2009)

reportaron un incremento significativo en los niveles citoplásmicos de cAMP de macrófagos murinos tras la absorción de micobacterias vivas.

2. Una vez que los niveles intracelulares de cAMP aumentan puede activarse la proteína quinasa A (PKA) y, así, liberar sus subunidades catalíticas (PKAc) que pueden fosforilar una amplia gama de sustratos celulares (Mellon et al., 1989), entre los cuales podemos encontrar a la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB). En un contexto de infección por *M. tuberculosis* se ha observado un aumento en los niveles de pCREB (CREB en su forma fosforilada) en macrófagos murinos a partir de los 15 minutos postinfección (Leopold Wager et al., 2023) y al tratar a los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* con un inhibidor de PKA los niveles de pCREB disminuyen aproximadamente un 70% (Agarwal et al., 2009).
3. Una vez que CREB se encuentra en su forma fosforilada puede translocarse al núcleo, reclutar a la proteína de unión a CREB (CBP) y unirse a las secuencias de ADN denominadas elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE) en los promotores de genes diana para inducir un programa transcripcional antiinflamatorio e inmunorregulador (Wen et al., 2010).
4. En el laboratorio se dilucidó mediante estudios bioinformáticos que el promotor del gen de *Klf10* tiene sitios putativos de unión para CREB que se encuentran conservados en los genomas de ratón, rata, chimpancé y humano; estos datos se confirmaron experimentalmente en un contexto neuronal hipotalámico murino mediante ensayos de luciferasa, mutaciones dirigidas en el promotor de *Klf10* y ensayos ChIP y, se concluyó que el promotor de *Klf10* está sujeto a regulación por el factor de transcripción CREB (Garduño-Tamayo, datos no publicados).

Por lo tanto, vale la pena explorar si en un contexto de infección por *M. tuberculosis* en macrófagos la sobreexpresión temprana de *Klf10* se encuentra regulada por CREB, el cual, como consecuencia de un estallido de cAMP en el citoplasma derivado de una infección con la micobacteria. *M. tuberculosis*, al inducir la expresión de *Klf10*, lo permite la supervivencia de la micobacteria en el macrófago al inhibir la producción de IFN γ e impedir la macropinocitosis (Madrid-Paulino et al., 2022).

CONCLUSIONES

- *M. tuberculosis* promueve la expresión del gen *Klf10* en BMDMs a partir de la hora postinfección.
- La presencia de TGF β 1 en el medio de cultivo incrementa los niveles de *Klf10* en BMDMs a tiempos cortos de exposición (desde 1 hora postinfección).
- La infección de BMDMs con *M. tuberculosis* aumentan la expresión de *Tgf β 2* a partir de las 2 horas postinfección.
- En los tiempos evaluados, la expresión de *Klf10* inducida por la micobacteria no involucra a TGF β , dado que los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* que expresan el gen *Klf10*, no expresan *Tgfb* ni incrementan los niveles proteicos de TGF β .
- La expresión de *Klf10* inducida por *M. tuberculosis* durante la infección de BMDMs es mediada a través de un mecanismo independiente TGF β .
- De manera preliminar, los niveles basales de TGF β 1 en cultivos de BMDMs infectados con *M. tuberculosis* son necesarios para mantener los niveles del mensajero *Klf10*.
- Otra forma de corroborar si la vía de señalización de TGF β está involucrada en la expresión temprana de *Klf10* en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* es inhibiendo la actividad de TGF β R2. Esto por que, independientemente si se sigue la vía canónica o no canónica de TGF β , es el sitio donde se une directamente TGF β para iniciar la vía de señalización. A continuación, se muestran dos estrategias experimentales para inhibir la actividad de TGF β R2:
 1. Dado que el ratón *Tgf β 2* *-/-* presenta letalidad embrionaria derivada de defectos en la hematopoyesis y vasculogénesis del saco vitelino (Oshima et al., 1996), una forma de inhibir la función de TGF β R2 sin alterar el DNA del huésped ni provocar efectos a largo plazo (Dominska & Dykxhoorn, 2010) es el uso de siRNAs. Haciendo uso de programas bioinformáticos (por ejemplo, BLOCK-iT RNAi Designer, Invitrogen) se seleccionarían 3-4 siRNAs que cubrieran diferentes regiones del mRNA de TGF β R2, los cuales se mandarían a sintetizar junto con un siRNA no específico. Los siRNAs se transfectarían en las células antes de la infección con *M. tuberculosis* y, una vez realizada la infección, se mediría la expresión de *Klf10* a diferentes tiempos postinfección.
 2. Una forma adicional de inhibir la función de TGF β R2 es el uso de anticuerpos bloqueantes como LY3022859 (Zhong et al., 2010). Para ello se infectarían las células con *M. tuberculosis* y, al momento de descartar la micobacteria y añadir medio fresco, se añadiría el anticuerpo bloqueante. Posteriormente, a diferentes tiempos postinfección, se mediría la expresión de *Klf10*.

REFERENCIAS

- Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S., & Bishai, W. R. (2009). Cyclic AMP intoxication of macrophages by a Mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase. *Nature*, 460(7251):98-102.
- Agarwal, N., & Bishai, W. R. (2009). cAMP signaling in Mycobacterium tuberculosis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47:393-400.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. Sexta edición. Garland Science.
- Aranda, P.S., LaJoie, D.M., Jorcyk, C.L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 33(2):366-369.
- Bai, G., Schaak, D. D., & McDonough, K. A. (2009). cAMP levels within Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG increase upon infection of macrophages. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 55(1): 68-73
- Bermudez, L. E. (1993). Production of transforming growth factor β by Mycobacterium avium-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . *Immunol*. 150:1838.
- Bialkowska, A.B., Yang, V.W., Mallipattu, S.K. (2017). Krüppel-like factors in mammalian stem cells and development. *Development*. 144(5):737-754.
- Biology C, Huang L, Chang H, et al (2016). 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*. 79:231-238.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol*. 15:749-795.
- Brennan, P.J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 64:29-63.
- Cao, Z., Wara, A.K., Icli, B., Sun, X., et al. (2009). Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells. *J Biol Chem*. 284:24914-24924.
- Cao, Z., Sun, X., Icli, B., Wara, A.K., Feinberg, M.W. (2010). Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* 116:4404-4414.
- Chen, Z., Wang, T., Liu, Z., Zhang, G., Wang, J., Feng, S., & Liang, J. (2015). Inhibition of autophagy by MiR-30A induced by mycobacteria tuberculosis as a possible mechanism of immune escape in human macrophages. *Japanese journal of infectious diseases*. 68(5):420-424.
- Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., Orme, I.M. (1993). Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 178(6):2243-7.
- Deghmane, A.E., Soualhine, H., Bach, H. et al. (2007). Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation. *J Cell Sci*. 120:2796-2806.

- De Martino, M., Lodi, L., Galli, L. & Chiappini, E. (2019). Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. *Frontiers in Pediatrics*. 7:1-8.
- Dominska M, Dykxhoorn DM. (2010) Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci* 123:1183–9.
- Fulton, S.A., Reba, S.M., Pai, R.K., Pennini, M., Torres, M., Harding, C.V., Boom, W.H. (2004). Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by Mycobacterium bovis BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun*. 72(4):2101-2110.
- Galagan, J. (2014). Genomic insights into tuberculosis. *Nat. Rev. Genet*. 15: 307-320.
- Garduño-Tamayo, N. A. (datos no publicados). Estudio de la función del factor de transcripción KLF10 durante la neurogénesis hipotalámica embrionaria. [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gatfield, J., Albrecht, I., Zanolari, B., Steinmetz, M.O., Pieters, J. (2005). Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol Biol Cell*. 16:2786-2798.
- Ge, P., Lei, Z., Yu, Y., Lu, Z., Qiang, L., Chai, Q. et al. (2022). M. tuberculosis PknG manipulates host autophagy flux to promote pathogen intracellular survival. *Autophagy*. 18(3):576-594.
- Gong, D., Shi, W., Yi, S.J., Chen, H., Groffen, J., Heisterkamp, N. (2012). TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol*. 13:31.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, 44(3), 463-475.
- Green, A.M., Difazio, R., Flynn, J.L. (2013). IFNγ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 190(1):270-7.
- Harding, C.V. & Boom, W.H. (2010). Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol*. 8:296-307.
- Harriff, M.J., Cansler, M.E., Toren, K.G., Canfield, E.T., Kwak, S., Gold, M.C., Lewinsohn, D.M. (2014). Human lung epithelial cells contain Mycobacterium tuberculosis in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8⁺ T cells. *PLoS One*. 9(5):e97515.
- Herrera-Barrios, M.T., Torres-Rojas, M., Juárez-Carvajal, E., Sada-Díaz, E. (2005). Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 18(4):327-336.
- Hirsch, C.S., Yoneda, T., Averill, L., Ellner, J.J., Toossi, Z. (1994). Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J. Infect. Dis*. 170(5):1229-37.
- Jasenosky, L.D., Scriba, T.J., Hanekom, W.A., Goldfeld, A.E. (2015). T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunol Rev*. 264(1):74-87.
- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., Pieters, J. (2007). Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. 130:37-50.

- Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs Jr, W.R., Guerin, M.E., Prados-Rosales, R. (2019). The Mycobacterium tuberculosis capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*. 476:1995-2016.
- Kaufmann, S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 1:20-30.
- Khan, N., Vidyarthi, A., Pahari, S., Agrewala, J.N. (2016). Distinct strategies employed by dendritic cells and macrophages in restricting Mycobacterium tuberculosis infection: different philosophies but same desire. *Int Rev Immunol*. 35:386-98.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., Palacios-Martínez, R. (2007). *Inmunología de Kuby* (Segunda edición). McGraw-Hill Interamericana.
- Koch, A. & Mizrahi, V. (2018). Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol*. 26(6):555-556.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:770-774.
- Leopold Wager, C. M., Bonifacio, J. R., Simper, J., Naoun, A. A., Arnett, E., & Schlesinger, L. S. (2023). Activation of transcription factor CREB in human macrophages by Mycobacterium tuberculosis promotes bacterial survival, reduces NF-kB nuclear transit and limits phagolysosome fusion by reduced necroptotic signaling. *PLoS pathogens*, 19(3): e1011297.
- Li, M. O., & Flavell, R. A. (2008). TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell*, 134(3), 392-404.
- Li, Y., Wang, Y. & Liu, X. (2012). The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clin Dev Immunol*. 2012:791392.
- Licona-Limón, P., Soldevila, G. (2007). The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights. *Immunol Lett*. 109(1):1-12.
- López-Agudelo, V. A., Baena, A., Barrera, V., Cabarcas, F., Alzate, J. F., Beste, D. J., ... & Barrera, L. F. (2022). Dual RNA sequencing of Mycobacterium tuberculosis-infected human splenic macrophages reveals a strain-dependent host-pathogen response to infection. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1803.
- Lyadova, I.V. & Panteleev, A.V. (2015). Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm*. 2015:854507.
- MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 94:5243-5248.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., Guerrero, R., Chica, C., Duro, R., Piqueras, M., Berlanga, M., Claros, M.G., García López, C., Gacto, M., Gilbert, I., Yero, D., Moriyón, I., Conde Raquel, Iriarte, M., ... & Barrachina, C. (2015). *Brock Biología de los microorganismos* (14a edición). Pearson Education.
- Madrid-Paulino, E.; Mata-Espinosa, D.; León-Contreras, J.C.; Serrano-Fujarte, I.; Díaz de León-Guerrero, S.; Villaseñor, T.; Ramon-Luing, L.; Puente, J.L.; Chavez-Galan, L.; Hernández-Pando, R.; Pérez-Martínez, L.; Pedraza-Alva, G. (2022). Klf10 favors Mycobacterium tuberculosis survival by impairing IFN γ production and preventing macrophages reprogramming to macropinocytosis. *J Leukoc Biol*. 112(3):475-490.

- Madrid-Paulino, E. (2023). El Papel del Factor Transcripcional Klf10 en el Desarrollo de la Tuberculosis. [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mehra, S., Foreman, T. W., Didier, P. J., Ahsan, M. H., Hudock, T. A., Kisse, R., ... & Kaushal, D. (2015). The DosR regulon modulates adaptive immunity and is essential for Mycobacterium tuberculosis persistence. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(10), 1185-1196.
- Mellon, P. L., Clegg, C. H., Correll, L. A., & McKnight, G. S. (1989). Regulation of transcription by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(13):4887-4891.
- Memon, A., Lee, W.K. (2018). KLF10 as a Tumor Suppressor Gene and Its TGF- β Signaling. *Cancers (Basel)*. 10(6):161.
- Murphy, Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Ehrenstein, M., Rivera Muñoz, B., and Palacios Martínez, J. R. (2009). *Inmunobiología de Janeway (7ª ed. en español)*. McGraw Hill Interamericana Editores.
- Murray, P.J., & Wynn, T. a (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11:723-737.
- Nasiruddin M., Neyaz M. K., Das S. (2017). Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberc. Res. Treat* 2017, 4920209. doi: 10.1155/2017/4920209
- Nicol, M.P. & Wilkinson, R.J. (2008). The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(10):955-65.
- Nüchel, J., Ghatak, S., Zuk, A.V., Illerhaus, A., Mörgelin, M., Schönborn, K. et al. (2018). TGFB1 is secreted through an unconventional pathway dependent on the autophagic machinery and cytoskeletal regulators. *Autophagy*. 14(3):465-486.
- O'Leary, S., O'Sullivan, M.P., and Keane, J. (2011). IL-10 blocks phagosome maturation in Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45:172-180.
- Olobo, J.O., Geletu, M., Demissie, A., Eguale, T., Hiwot, K., Aderaye, G., Britton, S. (2001). Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol.* 53(1):85-91.
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *Global Tuberculosis Report*.
- Oshima, M., Oshima, H., & Taketo, M. M. (1996). TGF- β receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Developmental biology*, 179(1), 297-302.
- Papadakis, K.A., Krempsi, J., Reiter, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmiento, O.F., Huseby, A., Johnson, A.J., Lomber, G.A., Urrutia, R.A., Faubion, W.A. (2015). Krüppel-like factor KLF10 regulates transforming growth factor receptor II expression and TGF- β signaling in CD8+ T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 308(5):C362-71.
- Pavón Romero, L., Jiménez Martínez, M. C., & Garcés. Alvarez, M. E. (2016). *Inmunología: molecular, celular y traslacional*. Wolters Kluwer.
- Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M., & Bao, S. (2008). Krüppel-like transcription factors: A functional family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 40(10):1996-2001.

- Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host & Microbe*. 3:399-407.
- Pradhan, G., Shrivastva, R. & Mukhopadhyay, S. (2018). Mycobacterial PknG Targets the Rab71 Signaling Pathway To Inhibit Phagosome-Lysosome Fusion. *J Immunol*. 201(5):1421-1433.
- Queval C. J., Brosch R., Simeone R. (2017). The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis. *Front. Microbiol.* 8, 2284. doi: 10.3389/fmicb.2017.02284
- Ramakrishnan L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 12(5):352-66.
- Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E. & Russell, D.G. (2007). Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. *Immunol Rev*. 219: 37-54.
- Russell, D.G. (2001). Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2:569-577.
- Saini, N. K., Baena, A., Ng, T. W., Venkataswamy, M. M., Kennedy, S. C., Kunnath-Velayudhan, S., et al. (2016). Suppression of autophagy and antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS47. *Nature microbiology*, 1(9):1-12.
- Saleh, M.T., & Belisle, J.T. (2000). Secretion of an acid phosphatase (SapM) by Mycobacterium tuberculosis that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J. Bacteriol*. 182:6850-6853.
- Schmierer, B. & Hill, C.S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: Molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8: 970-982.
- Shin, D. M., Jeon, B. Y., Lee, H. M., Jin, H. S., Yuk, J. M., Song, C. H., et al. (2010). Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS pathogens*, 6(12), e1001230.
- Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews* 16(3):463-496.
- Smith, M.R., Standiford, T.J., Reddy, R.C. (2007). PPARs in alveolar macrophage biology. *PPAR research*. 23812.
- Songane M., Kleinnijenhuis J., Netea M. G., Van Crevel R. (2012). The role of autophagy in host defence against Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb.)* 92, 388–396. doi: 10.1016/j.tube.2012.05.004
- Spittau, B. & Kriegelstein, K. (2011). Klf10 and Klf11 as mediators of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Tissue Res*. 347:65-72.
- Suárez, I., Fünfer, S.M., Kröger, S., Rademacher, J., Fätkenheuer, G., Rybniker, J. (2019). The diagnosis and treatment of tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2019 (116):729-735.
- Subramaniam, M., Harris, S.A., Oursier, M.J., et al. (1995). Identification of a novel TGF-β-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res*. 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., Turner, R.T., Oursler, M.J., Spelsberg,

- T.C. (2005). TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol.* 25(3):1191-9.
- Subramaniam, M., Hawse, J.R., Rajamannan, N.M., Ingle, J.N., and Spelsberg, T.C. (2010). Functional role of KLF10 in multiple disease processes. *BioFactors* 36:8-18.
 - Swamynathan, S. K. (2010). Krüppel-like factors: three fingers in control. *Human genomics*, 4(4), 1-8.
 - Toossi, Z., Young, T.G., Averill, L.E., Hamilton, B.D., Shiratsuchi, H., Ellner, J.J. (1995). Induction of transforming growth factor beta 1 by purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63(1):224-8.
 - Toossi, Z. & Ellner, J.J. (1998). The role of TGF- β in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87:107-114.
 - Torres-Huerta, A., Villaseñor, T., Flores-Alcantar, A., Parada, C., Alemán-Navarro, E., Espitia, C., Pedraza-Alva, G., Rosenstein, Y. (2017). Interaction of the CD43 Sialomucin with the *Mycobacterium tuberculosis* Cpn60.2 Chaperonin Leads to Tumor Necrosis Factor Alpha Production. *Infect Immun.* 85(3):e00915-16.
 - Upadhyay, S., Mittal, E. & Philips, J.A. (2018). Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathogens and Disease.* 76(4):1-12.
 - Vander-Ark, A., Cao, J., Li, X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell Signal.* 52:112-120.
 - Vergne, I., Chua, J., Lee, H.H., Lucas, M., Belisle, J., & Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis blocked by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:4033-4038.
 - Villaseñor, T., Madrid-Paulino, E., Maldonado-Bravo, R., Pérez-Martínez, L., & Pedraza-Alva, G. (2019). *Mycobacterium bovis* BCG promotes IL-10 expression by establishing a SYK/PKC α/β positive autoregulatory loop that sustains STAT3 activation. *Pathogens and disease*, 77(3):ftz032.
 - Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic *mycobacteria* promotes survival within macrophages. *Science.* 304:1800-1804.
 - Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., & Miller, L. S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *The Journal of Immunology*, 185(11):6413-6419.
 - Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., Pellacani, A., Wiesel, P., Chin, M. T. et al., Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J. Biol. Chem.* 2000. 275: 36653–36658.
 - Wilson, G. J., Marakalala, M. J., Hoving, J. C., Van Laarhoven, A., Drummond, R. A., Kerscher, B., ... & Brown, G. D. (2015). The C-type lectin receptor CLECSF8/CLEC4D is a key component of anti-mycobacterial immunity. *Cell host & microbe*, 17(2), 252-259.
 - Wynn, T.A. & Barron, L. (2010). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 30:245-257.
 - Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 496:445-455.

- Yuk, J.M., Shin, D.M., Lee, H.M., Yang, C.S., Jin, H.S., Kim, K.K., Lee, Z.W., Lee, S.H., Kim, J.M., Jo, E.K. (2009). Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe*. 6(3):231-43.
- Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E. et al. (2009). Coactivation of syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity*. 31:761-71.
- Zhang, F., Wang, H., Wang, X., Jiang, G., Liu, H., Zhang, G., Wang, H., Fang, R., Bu, X., Cai, S., Du, J. (2016). TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*.7(32):52294-52306.
- Zheng, H., Lu, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang H, Wang S, Zhao G, Zhang Y. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One*. 2008 Jun 11;3(6):e2375.
- Zhong, Z., Carroll, K. D., Policarpio, D., Osborn, C., Gregory, M., Bassi, R., ... & Wu, Y. (2010). Anti-transforming growth factor β receptor II antibody has therapeutic efficacy against primary tumor growth and metastasis through multieffects on cancer, stroma, and immune cells. *Clinical Cancer Research*, 16(4), 1191-1205.

ANEXOS

Cultivo celular de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)

La diferenciación de los macrófagos a partir de células de médula ósea ocurrió a lo largo de 7 días bajo condiciones ambientales de 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂. Durante este periodo, se realizó un cambio parcial del medio de diferenciación cada 48 horas, descartando 5 mL de los 10 mL totales del cultivo y añadiendo 5 mL de medio de diferenciación fresco. A partir del día 4 de cultivo se empezaron a apreciar pequeñas proyecciones en las células, y al 7 se hicieron evidentes en todas las células del cultivo; estas proyecciones son llamadas pseudópodos y son una de las características morfológicas más evidentes en los macrófagos que ayudan a distinguirlos de otros tipos celulares.

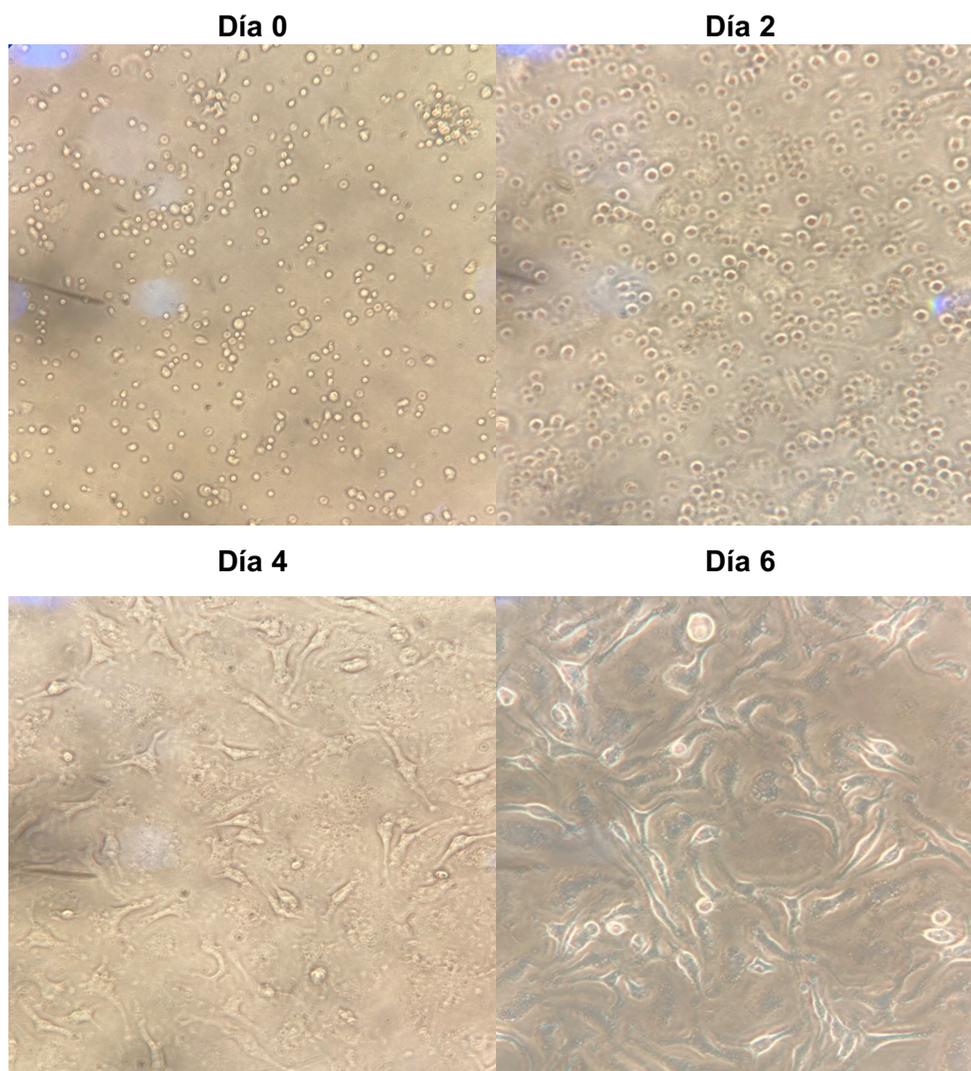


Figura suplementaria 1. Diferenciación de células de médula ósea en BMDMs.

Estandarización de la extracción RNA a partir de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)

Para realizar la transcripción inversa se necesita entre 0.5-1 ug de RNA de buena calidad, por se realizó una estandarización sobre el número de BMDMs necesarios

para obtener suficiente RNA para obtener cDNA. Para ello se sacrificó un ratón BALB/c WT macho de 12 semanas de edad a partir del cual se extrajo la médula ósea, la cual se diferenció en BMDMs; a partir del total de células obtenidas se hicieron cultivos celulares con 250 000, 500 000, 1 000 000, 2 000 000, 3 000 000 de células, respectivamente. Posteriormente se hizo una extracción de RNA por cada cultivo celular y se evaluó la concentración y pureza de las muestras por espectrofotometría obteniendo los siguientes resultados (Figura suplementaria 2):

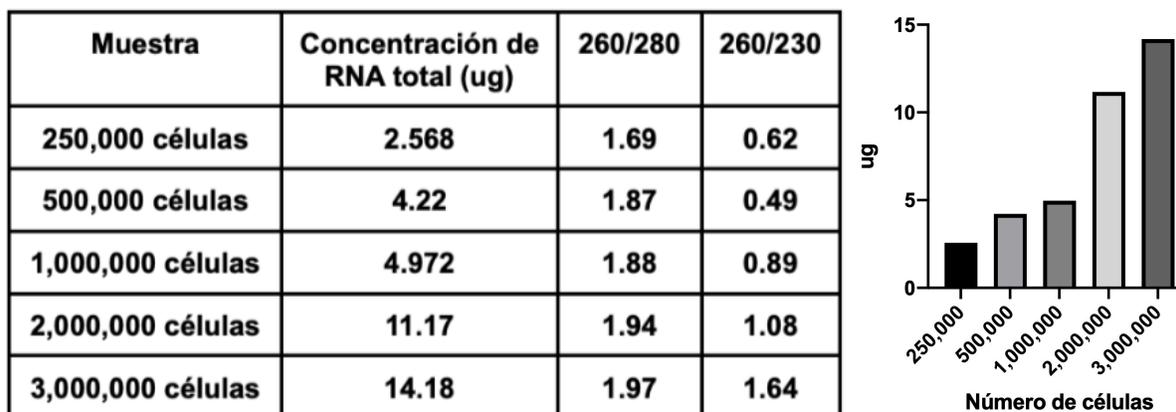


Figura suplementaria 2. Cuantificación del RNA de cultivos celulares con diferentes cantidades de BMDMs.

Así mismo, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia para analizar la integridad del RNA (Figura suplementaria 3). Las dos bandas intensas corresponden a las subunidades mayor y menor del RNA ribosomal y su presencia es signo de un RNA óptimo, es decir, no degradado.

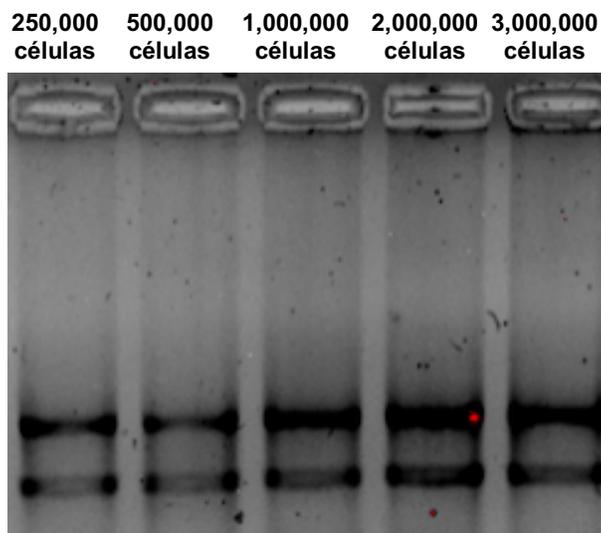


Figura suplementaria 3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia para analizar la integridad del RNA extraído de 250 000, 500 000, 1 000 000, 2 000 000, 3 000 000 de células, respectivamente.

Estandarización de primers para qPCR de *Actb*, *Klf10*, *Tgfβ1* y *Tgfβr2*

Previo a la qPCR de las muestras experimentales, se estandarizaron los primers para qPCR de los genes de interés del presente trabajo (*Klf10*, *Tgfβ* y *Tgfβr2*) y *Actb* como gen normalizador. La estandarización consistió en llevar a cabo, por cada gen, reacciones de qPCR con diferentes concentraciones de cDNA (se hicieron diluciones seriadas) a partir de las cuales se obtuvo:

- Una regresión lineal entre el logaritmo base 2 de las concentraciones de cDNA y los valores de la C_T de esas concentraciones.
- La ecuación de la recta, la cual indica el valor de la pendiente (m) y de la ordenada al origen de la regresión lineal.
- El valor de R^2 que describe la regresión lineal.
- La melt curve, que indica especificidad de la amplificación.
- La eficiencia de amplificación los primers

$$\text{Eficiencia} = \left(2^{\frac{-1}{m}} - 1\right)(100)$$

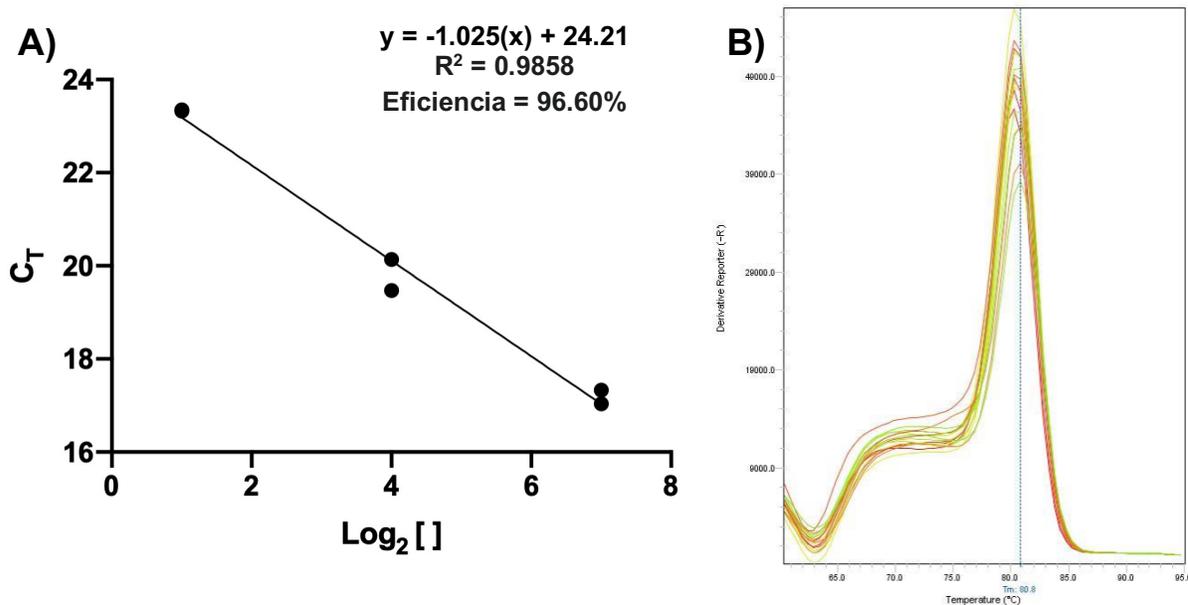


Figura suplementaria 4. Estandarización de los primers para qPCR para *Actb*. A) Curva estándar del gen *Actb* donde se indica la ecuación de la recta, el valor de R^2 y la eficiencia de amplificación de los primers. B) Melt curve del gen *Actb*.

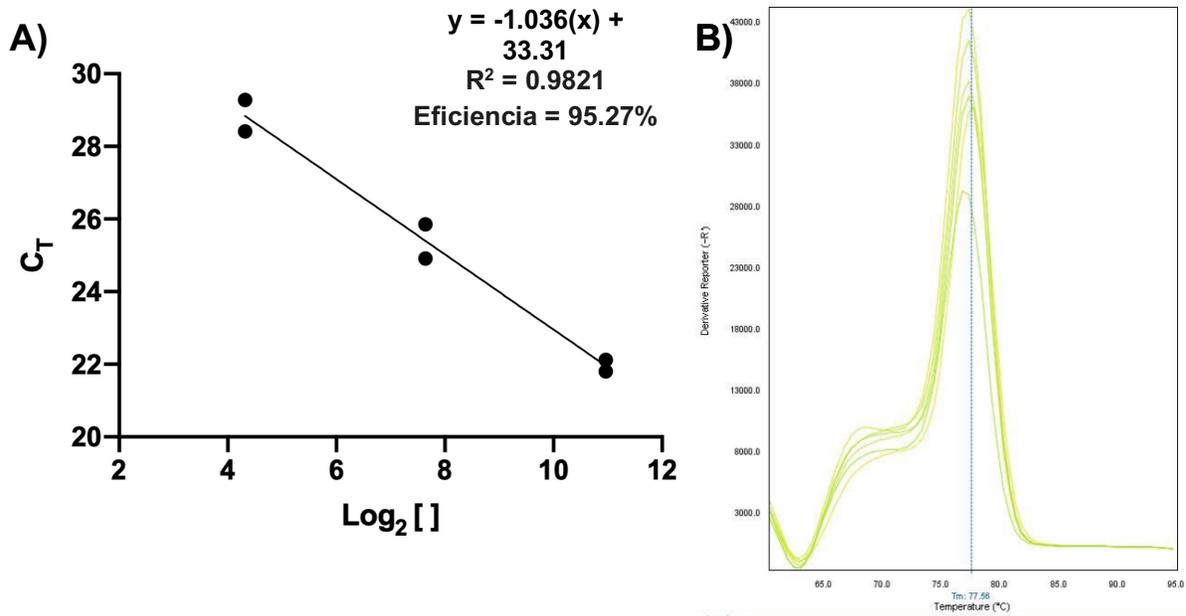


Figura suplementaria 5. Estandarización de los primers para qPCR para el gen *Klf10*. A) Curva estándar del gen *Klf10* donde se indica la ecuación de la recta, el valor de R^2 y la eficiencia de amplificación de los primers. B) Melt curve del gen *Klf10*.

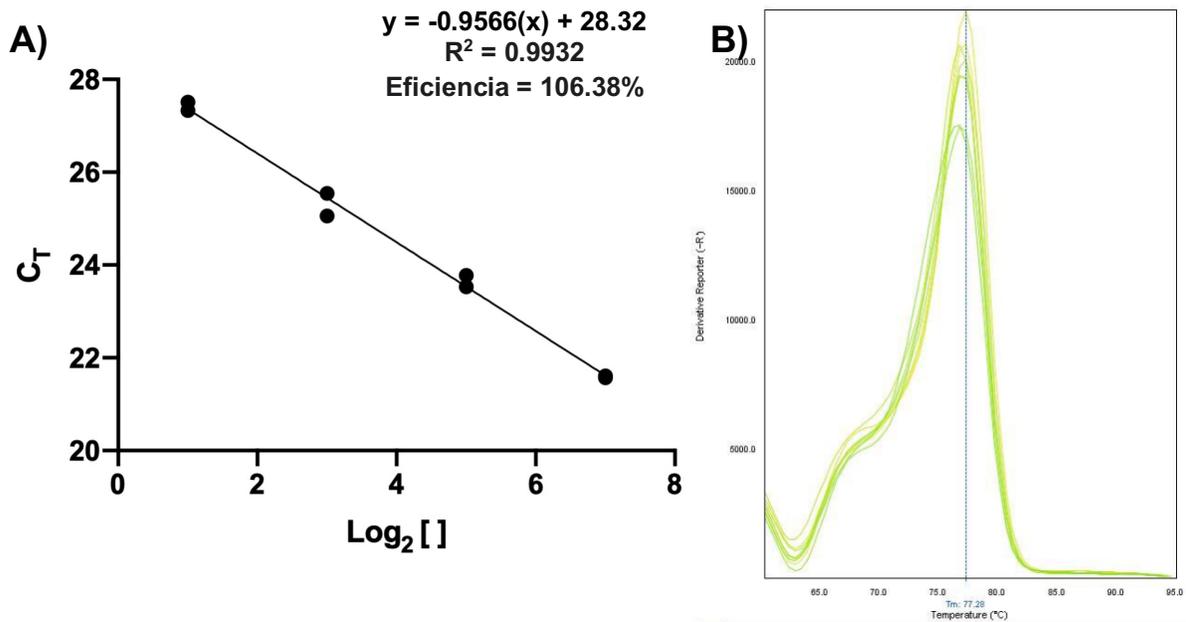


Figura suplementaria 6. Estandarización de los primers para qPCR para el gen *Tgfβ1*. A) Curva estándar del gen *Tgfβ* donde se indica la ecuación de la recta, el valor de R^2 y la eficiencia de amplificación de los primers. B) Melt curve del gen *Tgfβ1*.

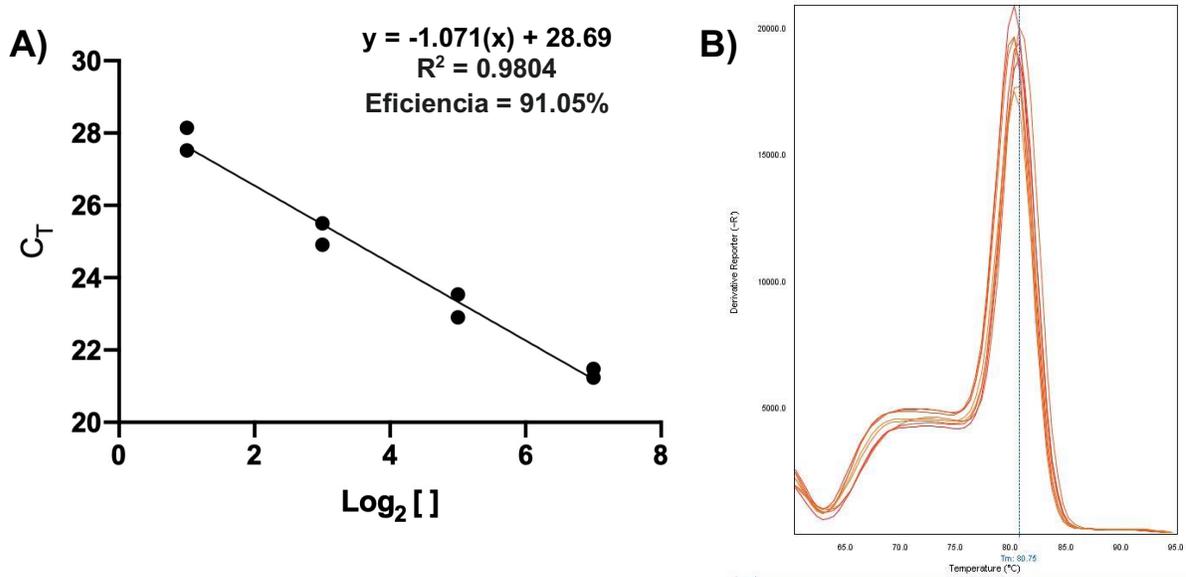


Figura suplementaria 7. Estandarización de los primers para qPCR para el gen *Tgfβ2*. A) Curva estándar del gen *Tgfβ2* donde se indica la ecuación de la recta, el valor de R² y la eficiencia de amplificación de los primers. B) Melt curve del gen *Tgfβ2*.

Geles de integridad de RNA de las muestras experimentales

Para corroborar que el RNA extraído de las muestras experimentales no estuviera degradado se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia. La presencia de dos bandas intensas es indicativo de un RNA ideal para llevar a cabo una transcripción inversa seguida de una PCR/qPCR.

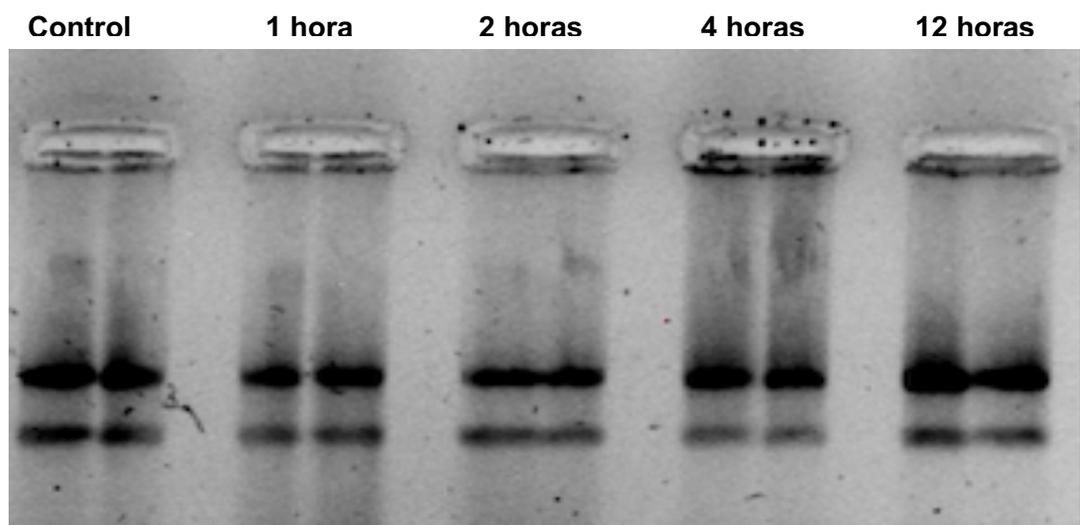


Figura suplementaria 8. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia para analizar la integridad del RNA de las muestras de BMDMs tratados con TGFβ1 exógeno (10 ng/mL) durante 1 hora, 2 horas, 4 horas y 12 horas, respectivamente.

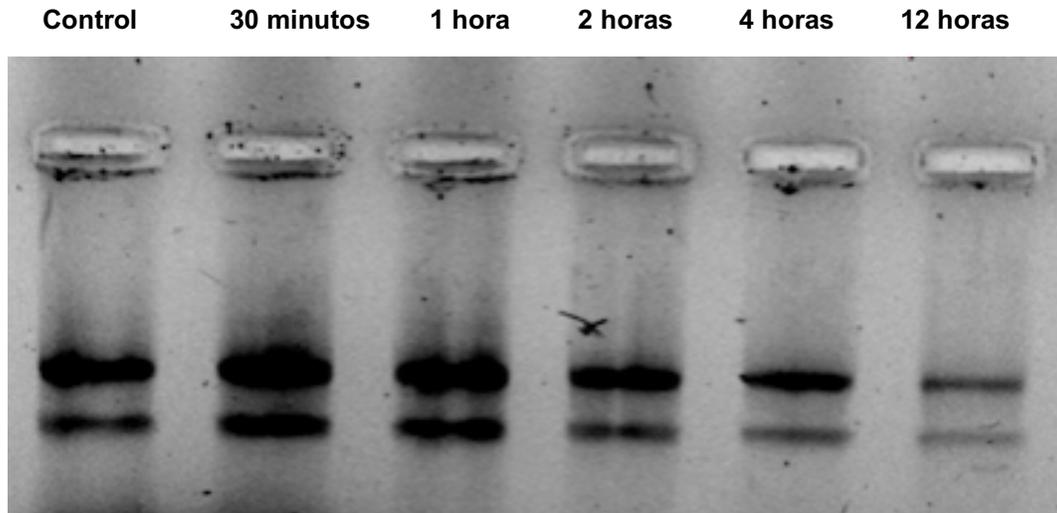


Figura suplementaria 9. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia para analizar la integridad del RNA de las muestras de BMDMs tratados con *M. tuberculosis* H37Ra MOI (5:1) durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 12 horas, respectivamente.

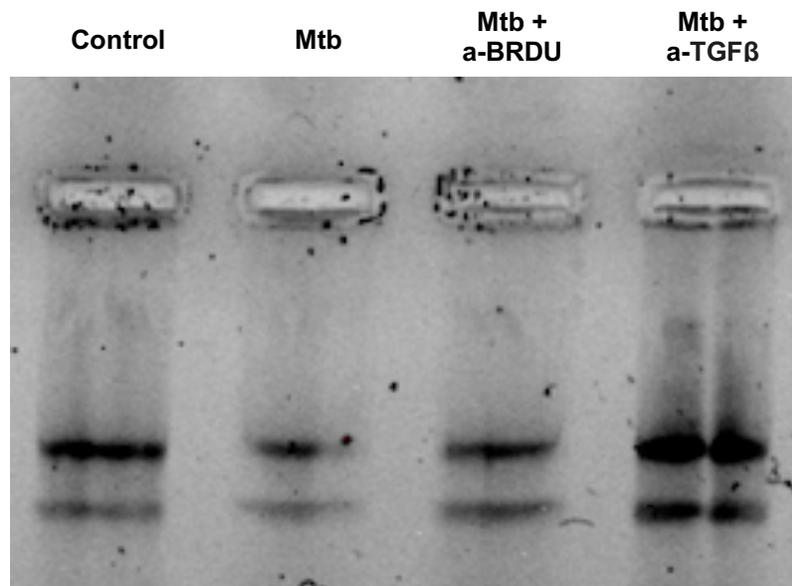


Figura suplementaria 10. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia para analizar la integridad del RNA de las muestras de BMDMs tratados con: i) *M. tuberculosis* H37Ra MOI (5:1) durante 4 horas (Mtb); ii) *M. tuberculosis* H37Ra MOI (5:1) durante 4 horas + anti-BRDU (Mtb+a-BRDU); iii) *M. tuberculosis* H37Ra MOI (5:1) durante 4 horas + anti-TGF β (Mtb+a-TGF β).