

# LA ENZIMA GLUCÓGENO SINTASA CINASA 3 REGULA LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B Y CREB DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CAUSADA POR *Staphylococcus aureus*\*

**Alejandro Huante Mendoza, Octavio Silva García, Rosa Rico Mata, María Cristina Maldonado Pichardo y Víctor Manuel Baizabal Aguirre**

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro s/n, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, correos E: baizabal@umich.mx, vmbaiza@gmail.com

## RESUMEN

La enzima glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) es una proteína cinasa de Ser/Thr, que regula la expresión de citocinas durante la respuesta inflamatoria. GSK3 modula la actividad del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB). En esta revisión se presenta uno de los mecanismos reguladores de la actividad de GSK3 y su efecto en las infecciones por *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

The enzyme glycogen synthase kinase 3 (GSK3) is a Ser/Thr kinase that regulates the expression of cytokines during the inflammatory response by modulating the activity of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cAMP response element-binding protein (CREB). This review presents one of the mechanisms that regulate GSK3 activity and its effect on *Staphylococcus aureus* infections.

## PALABRAS

### CLAVE:

GSK3, NF- $\kappa$ B, CREB, inflamación, *Staphylococcus aureus*.

### KEY WORDS:

GSK3, NF- $\kappa$ B, CREB, inflammation, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra agentes infecciosos, y consiste de una red interactiva de sistemas moleculares y celulares responsable de reconocer y eliminar microorganismos patógenos. Este tipo de inmunidad incluye una amplia variedad de cambios en la célula, cuyo objetivo es producir moléculas que coadyuven a eliminar al patógeno (1). La habilidad del sistema inmune innato de reconocer y responder a componentes microbianos se debe a la presencia de receptores tipo Toll (TLRs) (2, 3). Los TLR están presentes tanto en fagocitos profesionales (monocitos, macrófagos y células dendríticas) como en no profesionales como las células epiteliales y endoteliales. Estos receptores pueden discriminar entre distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que conducen a la activación de

una variedad de vías de transducción de señales, las cuales regulan la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta inflamatoria (4). La reacción inflamatoria es muy importante en la respuesta inicial a la infección y en ella participan neutrófilos, monocitos, macrófagos, moléculas del complemento, citocinas, quimiocinas, así como también proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana, que contribuyen coordinadamente a eliminar al patógeno del tejido infectado. Aunque la producción de citocinas pro-inflamatorias es importante para regular la defensa inicial del hospedero contra los patógenos invasores, la incapacidad de modular la intensidad o duración de la respuesta inflamatoria puede ser perjudicial y dar lugar a enfermedades inflamatorias crónicas (5).

En la última década, el interés se ha enfocado en explicar el mecanismo por el que las células participantes en la respuesta inflamatoria inicial

expresan citocinas pro-inflamatorias (p.ej. interleucina 8, IL-8) y más tarde apagan esta expresión y activan la síntesis de citocinas anti-inflamatorias (p.ej. IL-10), disminuyendo con ello la inflamación. En este sentido, se ha observado que uno de los principales mecanismos moduladores de la expresión de citocinas con actividad pro- y anti-inflamatoria es el que está mediado por la vía de señalización constituida por las enzimas fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), Akt (denominada también proteína cinasa B, PKB) y glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), activada por TLR (6, 7). Se ha propuesto que la activación de GSK3 es fundamental para inducir la producción de citocinas que promueven la inflamación (IL-8) o la disminuyen (IL-10), por medio de un mecanismo que involucra la participación de los factores de transcripción factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) y la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) (7).

En este trabajo se explicarán brevemente algunos de los principales conceptos de la respuesta inflamatoria, para después discutir la función de GSK3 como una enzima mediadora importante de la vía de transducción PI3K/Akt. Con esta información abordaremos con mayor detalle algunos aspectos mecanísticos de GSK3, lo que dará lugar a entender mejor la regulación que ejerce esta enzima sobre NF- $\kappa$ B y CREB en la respuesta inflamatoria. Por último, se describirán algunos resultados de nuestro laboratorio, donde evaluamos la regulación de la expresión de citocinas por GSK3 y una de las perspectivas de investigación que tenemos a mediano plazo.

## LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es el primer proceso fisiológico de respuesta a un daño o infección de un tejido y es fundamental tanto para la inmunidad innata como la adaptativa. Cuando un tejido es infectado por bacterias patógenas se activa un programa de respuesta que incluye la expresión de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y aminos bioactivas por diversos tipos de células como monocitos, células dendríticas, células asesinas naturales ("*natural killer cells*") y mastocitos. Entre las múltiples funciones de estos factores, una muy importante es el incremento de la permeabilidad vascular que conduce a la extravasación de leucocitos polimorfonucleares al sitio de infección. La mayor cantidad de información molecular que se tiene hasta ahora sobre el proceso inflamatorio proviene de estudios sobre componentes de las vías de transducción activados por el receptor al

factor de necrosis tumoral (TNFR), el receptor a IL-1 y los TLR (8). Las citocinas pro-inflamatorias predominantemente producidas son el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 e IL-27 (9). Estos péptidos activan procesos citotóxicos, celulares, humorales y alérgicos, que en conjunto tienen la finalidad de eliminar al agente causal del daño al tejido.

Es importante mencionar que la respuesta inflamatoria está sujeta a una regulación estricta, de tal forma que, una vez cumplido el objetivo de eliminar la causa de la inflamación, las mismas células involucradas cambian su programa genético para expresar ahora mediadores anti-inflamatorios, cuyo objetivo es restaurar la homeostasis. Cuando este programa anti-inflamatorio falla puede haber daño al tejido, lo que en ocasiones deriva en inflamación crónica y enfermedad (10). Se han identificado citocinas que tienen principalmente una función anti-inflamatoria, por ejemplo el antagonista del receptor a IL-1 (IL-1Ra), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), IL-10 e IL-35 (11).

Tal cambio de actividad celular pro-inflamatoria a anti-inflamatoria resulta relativamente fácil de entender si echamos andar nuestra lógica al formular preguntas como ¿qué sucedería si la respuesta inflamatoria continuara indefinidamente? La respuesta creo que es obvia, nuestros órganos se alterarían a tal grado que se perderían las funciones que mantienen al organismo en homeostasis. Para explicar el tránsito de mecanismos pro-inflamatorios a anti-inflamatorios, lo primero que se pensó fue que a medida que transcurría la inflamación, el tejido iba recuperando la homeostasis porque los mediadores pro-inflamatorios se iban degradando. Es decir, no se consideraba que las mismas células iniciadoras de la inflamación pudieran ser capaces de inhibir la expresión de moléculas pro-inflamatorias y activar la expresión y secreción de moléculas anti-inflamatorias. Esta forma de conceptualizar la respuesta inflamatoria ha cambiado y ahora se acepta que hay moléculas que son críticas para controlar el cambio de actividad pro- a anti-inflamatoria. Una de estas moléculas es la enzima GSK3 descubierta en 1980 por su efecto regulador de la síntesis de glucógeno (12). Sin embargo, la evidencia acumulada indica, sin lugar a dudas, que GSK3 tiene múltiples funciones, como su participación en el control de la inflamación (13). Durante la respuesta inflamatoria la activación de Akt regula la actividad de GSK3, por lo que a continuación estudiaremos un poco acerca de la vía de transducción que activa a Akt.

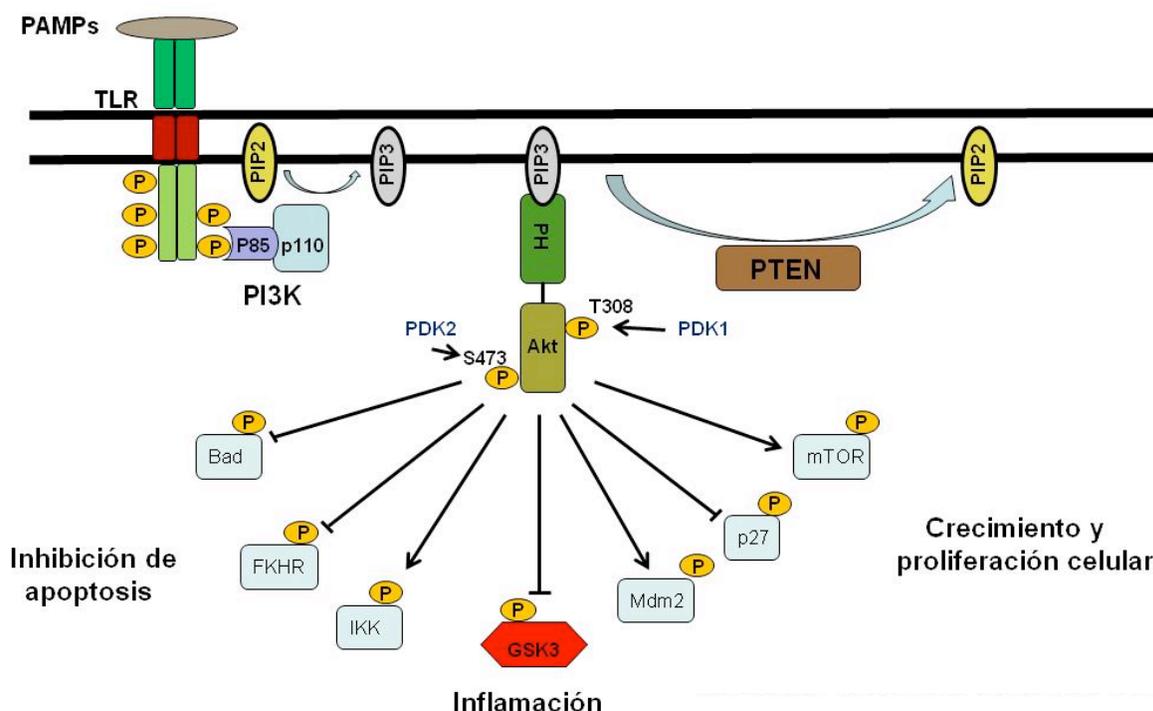


Figura 1. Modificado de referencia 14

### CARACTERÍSTICAS Y MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN PI3K/Akt/GSK3

La enzima PI3K es un heterodímero constituido por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una subunidad reguladora de 85 kDa (p85). De acuerdo con su estructura y mecanismo de activación las PI3K se clasifican en varias familias. Las enzimas de la clase IA (principales responsables de la producción de 3'-fosfoinosítidos) son activadas por receptores que tienen actividad de tirosina cinasa (RPTKs) y las que pertenecen a la clase IB por receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Dentro de la clase IA se han caracterizado tres isoformas de p110, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y siete isoformas de p85 que se sintetizan por procesamiento alternativo de tres genes,  $p85\alpha$ ,  $p85\beta$  y  $p85\gamma$  (14). La segunda enzima de la vía, denominada Akt/PKB, fue caracterizada como un homólogo del oncogén viral *v-akt*, que se considera responsable de causar leucemia en ratones (15). Debido a que *v-akt* y su contraparte en humanos presentan similitud con PKA y PKC, a esta nueva proteína cinasa de Ser/Thr se le llamó inicialmente PKB. Existen tres isoformas de Akt, Akt1, Akt2 y Akt3, con un 80% de homología entre ellas, aunque son codificadas por genes diferentes. Las tres Akt tienen en su región N-terminal un dominio de unión a plekstrina (PH) de aproximadamente 100 aminoácidos, que

le permite anclarse a la membrana plasmática mediante su interacción con 3'-fosfoinosítidos. Para activarse al 100%, Akt debe ser fosforilada en Thr 308 (localizada en su dominio catalítico) y en Ser 473 (localizada en su región C-terminal). La interacción de factores de crecimiento con RPTKs y de PAMPs (p.ej. péptidoglicano, PGN; ácido lipoteicoico, LTA y lipopolisacárido, LPS) con TLRs da lugar a la activación de Akt (16, 17).

La activación de la vía PI3K-Akt se inicia cuando un estímulo (p.ej. factores de crecimiento o PAMPs) promueve la fosforilación de residuos de Tyr en el dominio citosólico de los receptores (Fig. 1). Estas fosfo-Tyr son reconocidas por el dominio SH2 de p85, lo que trae como consecuencia la activación alostérica de p110 y la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP<sub>3</sub>). La presencia de PIP<sub>3</sub> en la capa interna de la membrana plasmática funciona como un mediador esencial para el funcionamiento de la vía PI3K-Akt, en la que participan PI3Ks de la clase IA. En esta vía, las dos enzimas que contienen dominios PH y, por lo tanto, pueden reconocer a PIP<sub>3</sub> son la cinasa de Ser/Thr dependiente de 3'-fosfoinosítido (PDK1), constitutivamente activa, y Akt. La interacción del dominio PH de Akt con PIP<sub>3</sub> cambia la conformación de Akt y expone sus sitios de fosforilación Thr308 y Ser473, los cuales son fosforilados por PDK1 y PDK2 (denominada también complejo diana de rapamicina de mamíferos, mTORC2), respec-

tivamente. Una vez activada, Akt fosforila una diversa variedad de sustratos, entre los cuales se encuentra GSK3, modulando así una variedad de procesos celulares como apoptosis, proliferación y sobrevivencia celular, e inflamación.

### **GSK3 MODULA LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS CON ACTIVIDAD PRO- Y ANTI-INFLAMATORIA**

GSK3 es una enzima constitutivamente activa muy importante en múltiples procesos biológicos, debido a que es el punto de convergencia de varias vías de señalización y porque regula la actividad de más de 50 sustratos (18). Su secuencia de aminoácidos está altamente conservada en eucariontes y se han caracterizado dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , que aparentemente no son redundantes porque la interrupción de la isoforma  $\beta$  en ratones resulta en letalidad embrionaria; esto significa que GSK3 $\alpha$  es incapaz de compensar la pérdida de GSK3 $\beta$  (19). Debido a la amplia influencia que GSK3 tiene en diversas funciones celulares, la actividad de GSK3 está regulada por diferentes mecanismos. Por ejemplo, su actividad puede ser inhibida por la fosforilación de residuos de Ser en la región N-terminal (Ser21 en GSK3 $\alpha$  y Ser9 en GSK3 $\beta$ ). Además, la actividad de GSK3 también está controlada por su asociación con proteínas de anclaje y su localización intracelular (6). Se ha demostrado que la activación o inhibición de GSK3 tiene una función importante en la regulación de la respuesta inmune al ejercer un control, mediado por TLRs, de la producción de citocinas con actividad anti- y pro-inflamatoria (7).

Las vías de señalización activadas por TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 son fundamentales para regular la producción de las citocinas pro-inflamatorias (p.ej. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) y anti-inflamatoria (p.ej. IL-4, IL-10) (20, 7, 21). El mecanismo por el que estos TLR regulan la expresión de citocinas que intervienen en la inflamación se estudió en monocitos estimulados con LPS (7). Los datos obtenidos indicaron que la inhibición de GSK3 $\beta$ , pero no de GSK3 $\alpha$ , redujo los niveles de las citocinas pro-inflamatorias y aumentó la expresión de IL-10, en respuesta a los agonistas de TLR, LTA (TLR2), lípido A sintético (TLR4), flagelina (TLR5) y CpG (TLR9). La inhibición de GSK3 ejerció un efecto regulador diferencial en la asociación de NF- $\kappa$ B (promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias) y CREB (promueve la expresión de citocinas anti-inflamatorias) con el co-activador nuclear, proteína de unión a CREB (CBP), es decir, GSK3 inactiva causó un aumento en la actividad de unión de CREB al DNA y, al mismo tiempo, inhibió apreciablemente la actividad nuclear de NF- $\kappa$ B (7). De esta manera, la interacción de NF- $\kappa$ B y CREB con CBP, regulada por la actividad de

GSK3, ocupa un lugar preeminente con respecto a la naturaleza y magnitud de la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias, lo que resulta en la modulación adecuada y precisa de la inflamación.

### **GSK3 $\alpha$ Y GSK3 $\beta$ REGULAN DIFERENCIALMENTE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES INFECTADAS CON *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram<sup>+</sup> causante de importantes enfermedades infecciosas en seres humanos y animales. Esta bacteria expresa una amplia variedad de factores de virulencia y PAMPs que inducen inflamación y son responsables de dañar al tejido (22). Las células del hospedero reconocen los PAMPs de *S. aureus* por medio del receptor TLR2. La interacción de estos PAMPs con TLR2 activa la vía de señalización PI3K/Akt/GSK3, lo cual da lugar a cierto número de respuestas celulares tales como proliferación, diferenciación, sobrevivencia, apoptosis e inflamación (23).

La participación de GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$  en infecciones por *Staphylococcus aureus* se observó por primera vez cuando la internalización de esta bacteria en células endoteliales produjo un incremento en la fosforilación e inhibición de la actividad de ambas isoformas de GSK3 (24). Un aspecto interesante de ese estudio fue que GSK3 $\alpha$  alcanzó un nivel de fosforilación y de inhibición mayor que GSK3 $\beta$ . Esta evidencia experimental indicó que no solo GSK3 $\beta$  está involucrada en procesos de infección e inflamación causados por bacterias patógenas, como se ha descrito ampliamente en la literatura (13), sino que también GSK3 $\alpha$  podría tener una función preponderante. Más adelante se pudo demostrar que ambas isoformas de GSK3 regulan la expresión de IL-12p40 en células endoteliales estimuladas con PGN de *S. aureus* (25). Esta citocina es muy importante porque controla la respuesta inmune innata durante la infección bacteriana y determina el tipo y duración de la respuesta inmune adaptativa. IL-12p40 es altamente inducible por LPS, LTA y PGN, por su interacción con TLRs y activación de la vía NF- $\kappa$ B (26). Aunque la función de IL-12p40 promueve un desarrollo apropiado de la respuesta inflamatoria inicial, su sobreexpresión es perjudicial para el tejido. Por ello, las células contrarrestan los efectos de esta citocina produciendo IL-10, que disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B y aumenta la actividad de CREB. Los datos de Cortés-Vieyra et al. (25) indicaron que la vía PI3K/Akt/GSK3 se activó por efecto de PGN, lo que se correlacionó con cambios en la actividad de GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ . Los autores pudieron establecer que la inhibición de la actividad de GSK3 $\alpha$  indujo un incremento en la expresión de IL-12p40, mientras

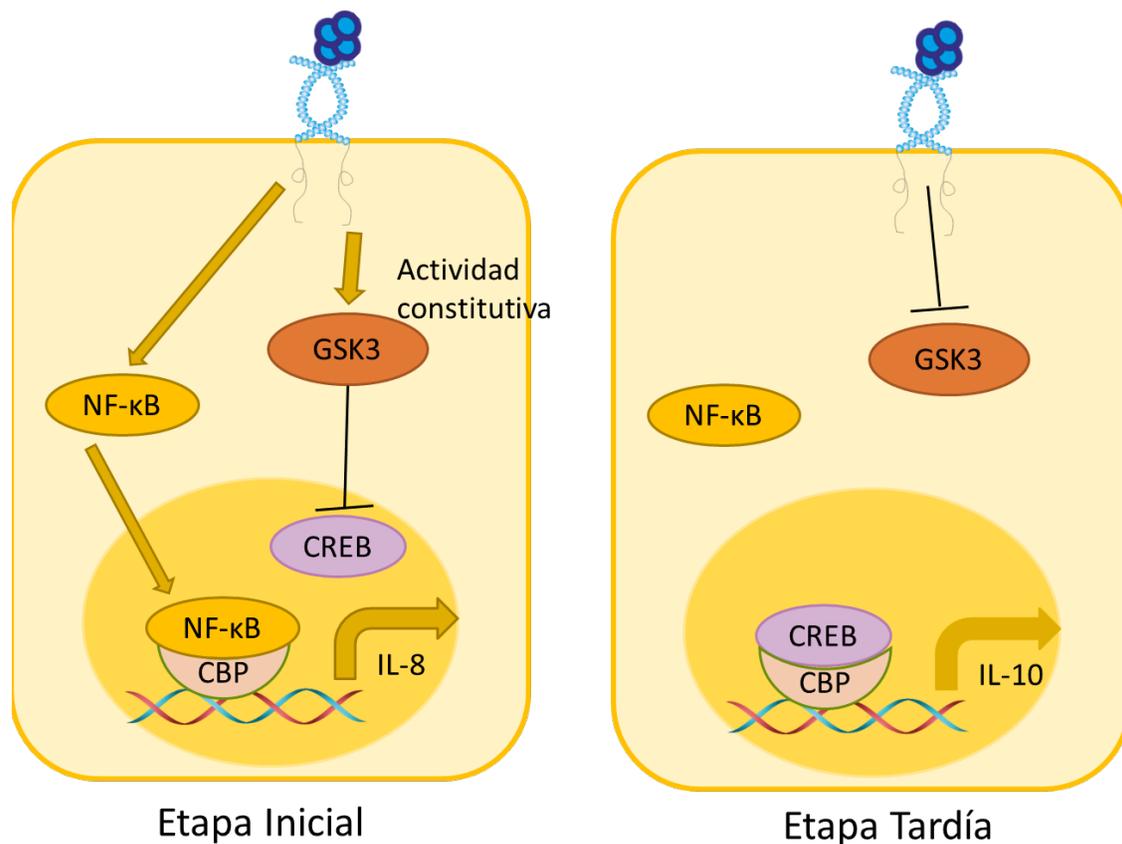


Figura 2.

que la inhibición de la actividad de GSK3 $\beta$  resultó en una expresión disminuida de esta citocina.

Los resultados más recientes obtenidos en nuestro grupo (Silva-García O y Baizabal-Aguirre VM, manuscrito enviado) han mostrado que la actividad de GSK3 $\alpha$  y, en menor grado, GSK3 $\beta$  en células endoteliales infectadas por *S. aureus* durante 60 min ejerció un efecto inhibitorio de la activación de CREB, limitando con ello su actividad transcripcional y promoviendo la actividad de NF- $\kappa$ B, el cual a su vez indujo la expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-8. Cuando se ensayaron tiempos de infección de 120 min observamos que GSK3 $\alpha/\beta$  alcanzó su fosforilación e inhibición máxima por Akt, lo cual inhibió indirectamente la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Esto causó un aumento en la actividad transcripcional de CREB, lo que estimuló la expresión de la citocina anti-inflamatoria y tolerogénica IL-10, y disminuyó simultáneamente la expresión de IL-8 (Fig. 2). Con base en estos resultados creemos que este mecanismo de "switch" molecular de la activación de un factor transcripcional pro-inflamatorio (NF- $\kappa$ B) en la fase inicial de la infección, a la activación de un factor transcripcional anti-inflamatorio (CREB) en la fase tardía de la infección por *S. aureus* explicaría en parte por qué las infecciones causadas por esta bacteria transitan de una fase de inflamación aguda

a una fase de inflamación crónica.

Estos datos plantean la posibilidad de que GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$  ejerzan una regulación diferencial de la expresión de genes pro- y anti-inflamatorios, por medio de la modulación de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, CREB y probablemente otros factores, dependiendo del tipo de célula infectada y de la bacteria en turno. En este contexto, uno de los objetivos a mediano plazo en nuestro laboratorio es realizar un análisis transcriptómico y proteómico global de los genes regulados por cada una de las isoformas de GSK3 cuando *S. aureus* infecta células endoteliales y epiteliales de humano. Esta evaluación *ómica* se combinará también con la identificación de factores de virulencia expresados por la bacteria y que son los responsables de activar NF- $\kappa$ B en fase temprana y CREB en fase tardía de la infección. Toda esta información que se genere sentará las bases para diseñar una estrategia biotecnológica cuya finalidad será eliminar *S. aureus* y promover la recuperación de la homeostasis celular.

#### AGRADECIMIENTOS

VMBA agradece los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Ciencia Básica 152518), y Coordinación de la Investigación

Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). RRM, recibió beca de CONACYT para estancia posdoctoral. AHM recibió

beca de CONACYT para estudios de doctorado y MCMP recibe beca de CONACYT para estudios de maestría.



## REFERENCIAS

1. Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER (2003) *Signal Transduction*. Academic Press. Elsevier Science, Orlando, FL, USA.
2. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394–397.
3. Yang RB (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395: 284–288.
4. Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503–508.
5. O’Neill LA, Dinarello CA (2000) The IL-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 21: 206–209.
6. Jope RS, Johnson G (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29: 95–102.
7. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6: 777–784.
8. Lawrence T, Fong C (2010) The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 519–523.
9. Steinke JW, Borish L (2006) Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 117: S441–S445.
10. Lawrence T, Gilroy DW (2007) Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol* 88: 85–94.
11. Commins SP, Borish L, Steinke JW (2010) Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 125: S73–S77.
12. Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107: 519–527.
13. Cortés-Vieyra R, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM (2012) Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. *J Inflamm (Lond)* 9: 23.
14. Fresno-Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M (2004) PI3K/AKT signaling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30: 193–204.
15. Staal SP (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5034–5037.
16. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541–6551.
17. Ruse M, Knaus UG (2006) New players in TLR-mediated innate immunity. *Immunol Res* 34: 33–48.
18. Beurel E, Michalek SM, Jope RS (2009) Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31: 24–31.
19. Chan MM, Cheung BK, Li JC, Chan LL, Lau AS (2009) A role for glycogen synthase kinase-3 in antagonizing mycobacterial immune evasion by negatively regulating IL-10 induction. *J Leukoc Biol* 86: 283–291.
20. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN (2001) Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69: 1477–1482.
21. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banachereau J (2001) Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167: 5067–5076.
22. Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 54: 399–409.
23. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499–511.
24. Oviedo-Boyso J, Cortés-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Finlay BB, Baizabal-

- Aguirre VM (2011) The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect Immun* 79: 4569–4577.
25. Cortés-Vieyra R, Silva-García O, Oviedo-Boyso J, Huante Mendoza A, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM (2015) The glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  and  $\beta$  isoforms differentially regulates interleukin12p40 expression in endothelial cells stimulated with peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 10(7): e0132867. doi:10.1371/journal.pone.0132867.
26. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ 2003 The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 361–368.