UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE TGF-β_1 EN EL SISTEMA DE INFECCIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS DE INFLUENZA A.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

MCB. Genoveva Bustos Rivera Bahena

TUTOR

Dr. Jose Luis Montiel Hernández
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr.Pavel Isa
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Dr.Fernando R. Esquivel Guadarrama
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Ciudad de México. febrero 2022

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios que es el motor de mi vida.

A mis papitos, mi don Beto y mi Tesita todo lo que soy es gracias ustedes, viven en mi corazón y en mi memoria en cada instante de mi vida. Por que siempre fueron mis mejores maestros de vida y siempre serán mi mayor orgullo.

A mis hermanitas Carito y Takita por ser mis mejores amigas y compañeras de vida, porque muchas veces ustedes se han convertido en mis hermanas mayores y jamás han dudado de mi, por que fueron las mayores impulsoras en este proceso, gracias por estar a mi lado. Gracias por esos bodoques, que iluminan cada dia con sus ocurrencias y sonrisas, mi Franco, Demian y Sofi.

A RUA por que jamás has dudado y siempre te has sentido orgulloso de mi, gracias por tu confianza, tu compañía, tu lealtad, siempre animándome por alcanzar mis sueños, desvelándote a mi lado. Por que eres de los motivos más importantes para alcanzar esta meta.

A Amed y Poncho por ser parte importante de mi familia, mis hermanos y amigos.

Al Dr. José Luis Montiel por permitirme desarrollar este proyecto, sus enseñanzas, por que ha sido un buen jefe, su ayuda y apoyo y comprensión, gracias por su amistad.

Al Lab. 13, Facultad de Farmacia, por el apoyo y disponibilidad para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Pavel Isa por todas las molestias, apoyo y por sus valiosos comentarios en el desarrollo de este proyecto. Por donarnos amablemente el virus utilizado en este estudio, y sobre todo, su disposición a siempre apoyarme.

Al Dr. Fernando Esquivel por su apoyo, comentarios y ayuda. Por su asesoría para el desarrollo de este proyecto.

Al comité evaluador por sus valiosos comentarios para la mejora de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca con número de registro 32864 para mis estudios de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A los apoyos de CONACyT (CB2007SALUD-2007-C01-82772), Consejo de Ciencia y Tecnología del Distrtito Federal (041-2009) y PROMEP-SEP/UAEM (2005-07).

INDICE

INDICE DE FIGURAS ..... **I**

ABREVIATURAS ..... **III**

RESUMEN **1**

ABSTRACT **2**

I. INTRODUCCIÓN. **3**

I.1 TGF-β. 3

I.1.1 GENERALIDADES Y ESTRUCTURA DE TGF-β. 3

I.1.2 RECEPTORES PARA TGF-β_1. 5

I.1.3 SEÑALIZACIÓN 6

I.1.4 VÍA CANÓNICA DE TGF-β_1. 6

I.1.5 VIA NO CANÓNICA O INDEPENDIENTE PARA TGF-β_1. 8

I.1.6 FUNCIONES DE TGF-β_1 9

I.1.7 TGF-β_1 EN EL CONTEXTO DE INFECCIONES POR MICROOGANISMOS. 10

I.1.8 TGF-β_1 EN EL CONTEXTO DE INFECCIONES POR VIRUS. 11

I.2 INFLUENZA 15

I.2.1 VARIACIÓN ANTIGÉNICA Y ZOONOSIS. 18

I.2.2 ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA. 21

I.2.3 RESPUESTA INMUNE FRENTE A INFLUENZA. 23

I.2.4 RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A INFLUENZA. 24

I.2.5 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA FRENTE A INFLUENZA. 28

I.3 TGF-β_1 E INFLUENZA. 29

II. JUSTIFICACIÓN. **32**

III. HIPOTESIS **33**

IV. OBJETIVOS **33**

IV.1 OBJETIVO GENERAL 33

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

V. MATERIALES Y MÉTODOS **34**

V.1 CULTIVOS CELULARES. 34

V.2 PREPARACIÓN DE STOCK VIRAL Y TITULACIÓN EN CÉLULAS MDCK. 34

V.3 PURIFICACIÓN DE VIRUS. 34
V.4 TINCIÓN PARA ANÁLISIS POR MICROSCOPIA..... 35
V.5 INFECCIÓN VIRAL Y ESTIMULACIÓN CON TGF-β_1. 36
V.6 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT. 37
V.7 MICROARREGLO DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A APOPTOSIS..... 38
V.8 ANÁLISIS DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO. 39
V.9 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ELISA. 39
V.10 CUANTIFICACIÓN DE FOCOS INFECTIVOS. 40
V.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 40
VI. RESULTADOS. 41
VI.1 OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL STOCK VIRAL. 41
VI.2 EFECTO DE TGF-β_1 SOBRE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR IAV. 44
VI.3 EFECTO DE TGF-β_1 SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL. 48
VI.4 EFECTO DE TGF-β_1 EN LA SECRECIÓN DE IL-1β DEBIDO A LA INFECCIÓN POR IAV. . 50
VI.5 EFECTO DE TGF-β_1 EN LA SEÑALIZACIÓN DEBIDO A LA INFECCIÓN POR IAV..... 53
VI.6 EFECTO DE TGF-β_1 COMO TRATAMIENTO POSTERIOR A LA INFECCIÓN POR IAV. ... 57
VII. DISCUSIÓN. 61
VII.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO..... 65
VIII. CONCLUSION. 67
IX. PERSPECTIVAS 67
X. BIBLIOGRAFIA. 68
XI. ANEXOS..... 73
ARTICULO PUBLICADO..... i

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE TGF-β Y SU ASOCIACIÓN CON LAP Y LTBP. **4**

FIGURA 2. SÍNTESIS Y ACTIVACIÓN DE TGF-β_1..... **5**

FIGURA 3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR TGF-β_1. ..... **8**

FIGURA 4. CONTROL DE LA RESPUESTA POR TGF-β_1 UTILIZADA POR LOS VIRUS..... **13**

FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE INFLUENZA A. **17**

FIGURA 6. CAMBIO Y DERIVA ANTIGÉNICA. **19**

FIGURA 7. CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS DE INFLUENZA. **23**

FIGURA 8. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS INTERFERONES. **26**

FIGURA 9. PANEL DE APOPTOSIS R&D SYSTEMS..... **38**

FIGURA 10. PURIFICACIÓN VIRUS INFLUENZA A H1N1. ..... **41**

FIGURA 11. ENSAYO DE PLACAS LÍTICAS EN CÉLULAS MDCK. **42**

FIGURA 12. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES DE VIRUS PURIFICADO POR GRADIENTE DE SACAROSA POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE..... **43**

FIGURA 13. INMUNODETECCIÓN DE NS1 POR INFECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA EN LA LÍNEA CELULAR A549 MEDIANTE WESTERN BLOT Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. **44**

FIGURA 14. EFECTO DE TGF-β_1 EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INFLUENZA H1N1 MEDIANTE ANÁLISIS EN CITOMETRIA DE FLUJO EN LA LÍNEA CELULAR A549. ..... **45**

FIGURA 15. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 REDUCE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS EN CÉLULAS INFECTADAS POR IAV EN LA LÍNEA CELULAR A549. ..... **46**

FIGURA 16. TGF-β_1 REDUCE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE PROTEÍNAS APOPTOTICAS EN UN ANÁLISIS DE HEAT MAP..... **47**

FIGURA 17. ANÁLISIS GRÁFICO DE ABUNDANCIA RELATIVA DE PROTEÍNAS APOPTOTICAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS..... **48**

FIGURA 18. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE EL TIEMPO DE APARICIÓN Y LA ABUNDANCIA RELATIVA DE M1 EN CÉLULAS A549. ..... **49**

FIGURA 19. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LOS TÍTULOS VIRALES CUANTIFICADOS COMO UNIDADES FORMADORAS DE FOCOS (UFF) EN CÉLULAS A549 A 24 Y 48 HPI. **49**

FIGURA 20. INDUCCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-1 EN CÉLULAS A549..... **50**

FIGURA 21. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LA ABUNDANCIA DE LA FORMA DE CASPASA-1 ACTIVA A LO LARGO DE UNA CINÉTICA DE 24 HORAS EN CÉLULAS A549..... **51**

FIGURA 22. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LA FORMA DE CASPASA-1 EN CÉLULAS A549. ..... **52**

FIGURA 23. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1β. **52**

FIGURA 24. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, MODIFICA EL PERFIL DE SECRECIÓN DE TGF-β_1. ..... **53**

FIGURA 25. EL NIVEL DE LOS RECEPTORES PARA TGF-β_1 (TβRI Y TβRII) SE INCREMENTA BAJO CONDICIONES DE INFECCIÓN. **54**

FIGURA 26. TGF-β_1 ACTIVA SU VÍA CANÓNICA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN POR FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3. ..... **54**

FIGURA 27. LA PRE-ESTIMULACIÓN CON TGF-β_1 INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3. ..... **55**

FIGURA 28. LA PRE-ESTIMULACIÓN CON TGF-β_1 INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3. ..... **55**

FIGURA 29. LA INFECCIÓN CON IAV INCREMENTA LA ABUNDANCIA DE SMAD-7. ..... **56**

FIGURA 30. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 E INFECCIÓN CON IAV INCREMENTA LA ACTIVACIÓN DE SMAD-2/3. ..... **57**

FIGURA 31. LA INFECCIÓN CON IAV INCREMENTA LA ABUNDANCIA RELATIVA DE SMAD-7. ..... **57**

FIGURA 32. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 POSTERIOR A LA INFECCIÓN CON IAV,, MANTIENE EL PERFIL DE DE APARICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3 CON RESPECTO A LA INFECCIÓN POR IAV. **58**

FIGURA 33. EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 DESPUÉS DE LA INFECCIÓN POR IAV MANTIENE EL PERFIL DE APARICIÓN DE SMAD-7. ..... **58**

FIGURA 34. EL PERFIL DE APARICIÓN DE SMAD-7 DE LOS TRATAMIENTOS IAV Y DE IAV + TGF-β_1 NO SE MODIFICA. **59**

FIGURA 35. EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 POSTERIOR A LA INFECCIÓN POR IAV MANTIENE EL PERFIL DE APARICIÓN DE M1 COMPARADO CON LA INFECCIÓN POR IAV. **59**

FIGURA 36. EL PERFIL DE APARICIÓN DE M1 DE LOS TRATAMIENTOS IAV Y DE IAV+TGF-β_1 NO SE MODIFICA. **60**

FIGURA 37. SMAD-7 SE RELACIONA CON LOS EFECTOS DEL VIRUS SOBRE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS A549. ..... **64**

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
AS	Acido siálico
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-X	B-cell lymphoma-extra large protein
BSA	Albúmina sérica bovina
CARD	Dominio de reclutamiento de la caspasa
CDC	Centro de control de enfermedades
COPD	Enfermedad pulmonar crónico obstructiva
DAPI	4 ',6-diamidino-2-fenilindol, marcador fluorescente
EMC	Matriz extracelular
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal	Galactosa
HA	Hemaglutinina
HAU	Unidades de hemaglutinación
hpi	Horas post-infección
hs	Horas
HSP	Heat Shock proteina, proteína de choque térmico
IAV	Virus de Influenza A
iIAV	Virus de Influenza A inactivado
IFN-α/β	Interferón tipo 1 α/β
IFN-γ	Interferón γ
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
IMC	Indice de masa corporal
IP	Yoduro de propidio
kDa	kiloDaltones
KSHV	Herpes virus asociado al Sarcoma de Kaposi
LAP	Proteína asociada de latencia
LPS	Lipopolisacárido

M1, M2	Proteína de Matriz 1, 2
MAPK	Cinasa activada por mitógenos
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells, células de riñón de perro
MEM	Medio esencial mínimo
MOI	Multiplicidad de infección
NA	Neuranimidasa
NF-κB	Factor nuclear kB
NLS	Señal de Localización nuclear
NLR	Receptor tipo NOD
NLRP	Receptor tipo NOD con dominio Pyrina
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido Nítrico
NP	Nucleoproteína
NS1,NS2	Proteína viral no estructural 1, 2
ORF	Marco de lectura abierto
PAI-1	Proteína activadora de plasminógeno 1
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
pdm	Pandémico
pfu	Unidades formadoras de placa
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 cinasa
RIG	Receptor inducible por ácido retinoico
RLR	Receptores de helicasa de tipo RIG
RNP	Ribonucleoproteínas
Rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus sincicial respiratorio
SFB	Suero fetal bovino
TβRI	Receptor tipo I del TGF-β_1
TβRII	Receptor tipo II del TGF-β_1
TβRIIdn	Doble negativo del gel para el receptor tipo II del TGF-β_1
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th	Linfocitos T cooperadores
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β

TLR	Receptor tipo TOLL
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de inmunodeficiencia de simio
XIAP	X-linked chromosome IAP, inhibidor de la proteina IAP ligada a X
WHO	Organización mundial de la salud

RESUMEN

La infección por virus Influenza A (IAV) es una enfermedad de gran riesgo a nivel mundial, debido a que puede favorecer la generación de epidemias y pandemias, por lo que su estudio sigue siendo de gran importancia. Por otro lado, es bien conocido que la infección por IAV induce una respuesta inflamatoria y de muerte celular, que sin un tratamiento adecuado puede derivar en complicaciones respiratorias que pueden poner en riesgo la vida de los individuos. A este respecto, estudios previos han sugerido que la citocina TGF-β_1 podría ejercer funciones de modulación de la respuesta celular durante el curso de esta infección viral. En ese contexto, es bien conocido que TGF-β_1 tiene importantes efectos anti-inflamatorios y tolerogénicos a nivel inmunológico, pero es poco conocido su efecto celular sobre la infección viral.

La expresión, activación y función de TGF-β_1 podrían estar asociado funcionalmente con la respuesta de la célula infectada por IAV. Es por eso que en este proyecto se evaluó el impacto de la activación de la vía de señalización intracelular del TGF-β_1 en un modelo de infección de células A549 por el virus Influenza A H1N1(New Caledonia/99). La infección con IAV in vitro en células A549, promueve el incremento de los niveles de Smad-7 y, por lo tanto, inhibe los efectos anti-inflamatorios potencialmente inducidos por TGF-β_1, ya que la pre-incubación con TGF-β_1 induce la fosforilación de Smad 2/3 reflejándose en una reducción de proteínas apoptóticas, una reducción en la cuantificación de IL-1β por ensayos de ELISA, así como una reducción en la cuantificación de partículas víricas infectivas a 48 hpi.

ABSTRACT

Influenza virus infection is a high-risk disease worldwide, because it can favor the generation of epidemic and pandemic, so its study continues to be of great importance. On the other hand, it is well known that infection by type A influenza viruses (IAV) induces an inflammatory response and cell death, which without proper treatment can lead to respiratory complications that can put the lives of individuals at risk. Previous studies have suggested that the cytokine TGF-β_1 could exert functions modulating the cellular response during the course of IAV viral infection. In this context, it is well known that TGF-β_1 has important anti-inflammatory and tolerogenic effects at the immunological level, but its cellular effect on viral infection is poorly understood.

The expression, activation and function of TGF-β_1 could be functionally associated with the response of the cell infected by the Influenza virus. In this project we evaluated the impact of the activation of the intracellular signaling pathway of TGF-β_1, in a model of infection of A549 cells by the Influenza H1N1 virus (New Caledonia / 99). In the context of infection with IAV *in vitro* with A549 cells, the infection promotes the increase of the levels of Smad-7 and, therefore, inhibits the anti-inflammatory effects potentially induced by TGF-β_1, since the pre-incubation with TGF-β_1 induces the phosphorylation of Smad 2/3 reflected in a reduction of apoptotic proteins, a reduction in the quantification of IL-1β by ELISA assays, as well as a reduction in the quantification of infective viral particles at 48 hpi.

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 TGF-β.

I.1.1 GENERALIDADES Y ESTRUCTURA DE TGF-β.

La súper familia del TGF-β está compuesta por diversas proteínas responsables de varias actividades en diversos tipos celulares, tales como proliferación, migración, inflamación, reparación tisular, diferenciación celular, apoptosis, respuesta inmune, así como en el desarrollo embrionario de una gran cantidad de organismos. Existen más de 30 miembros de esta súper familia incluyendo a la familia de TGF-β (1,2 y 3), activinas, BMP, inhibinas, proteína Nodal, miostatina, la sustancia inhibitoria Mulleriana [1]. En humanos se expresan 3 isoformas de TGF-β (TGF-β_1, TGF-β_2 y TGF-β_3), las cuales se secretan como precursores inactivos y requieren de su activación antes de unirse a su receptor en la membrana celular para ejercer su función.

TGF-β_1, es una citocina pleiotrópica, con importantes funciones sobre diferentes tipos celulares durante el desarrollo embrionario, como los cartílagos, el hueso y la piel, jugando un papel importante en el crecimiento y diferenciación de estos tejidos. TGF-β_1 estimula la quimiotaxis de monocitos, linfocitos, neutrófilos, migración de fibroblastos, y juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica, la reparación tisular y el desarrollo de fibrosis [1]. Esta última función, está relacionada con el control de la producción de matriz extracelular en células mesenquimales, además de que los efectos de esta citocina sobre la matriz extracelular se manifiestan a diferentes niveles, ya sea a partir de la expresión de proteínas de la matriz extracelular, la inhibición de la expresión de proteasas que degraden la matriz, la estimulación de inhibidores de proteasas o la regulación de la expresión de integrinas, los cuales actúan como receptores de diversos componentes de la matriz extracelular. Todas estas funciones son fundamentales en el proceso de reparación tisular, y explica el papel de TGF-β_1 en la fibrosis, la reparación de tejidos, enfermedades autoinmunes, parasitosis, asma, cáncer y en la respuesta a patógenos [1-3].

TGF-β_1 es una proteína dimérica unida mediante enlaces disulfuro con un peso molecular de 25 kDa en su forma activa. Todas las isoformas se secretan como precursores inactivos (pro-proteína) que requieren activarse previo a su unión a su receptor. La forma precursora o pro-pre-TGF-β_1 tiene una longitud de 390-412 aminoácidos, de los cuales la LAP (proteína asociada a la latencia) la constituyen 279, mientras que TGF-β_1 maduro está formado por 112 aminoácidos. LAP posee varias funciones entre las cuales se reconoce que favorece el plegamiento adecuado de la cadena polipeptídica en el Retículo endoplásmico y, por otro lado, evita que TGF-β_1 una vez secretado, se una a sus receptores asegurando un reservorio extracelular

de TGF-β_1 que pueda ser activado tan pronto exista una demanda del mismo para un efecto autócrino o parácrino (Figura 1).

Después de su síntesis, TGF-β_1 se dimeriza y en Golgi la pro-proteina es cortada en su extremo C-terminal (en la secuencia RXXR) por una endoproteasa del tipo furina, sin embargo, el dominio biológicamente activo permanece asociado de manera no covalente a LAP, a esta forma inactiva asociación se conoce como "small latent complex" (SLC). Algo importante a señalar, es que el complejo LAP-TGF-β tiene sitios de glicosilación en el extremo N-terminal que favorecen su secreción por la célula. Una vez secretado TGF-β_1 inactivo, el complejo SLC puede asociarse con una glicoproteína de 120-240 kDa conocida como proteína de unión a TGF-β_1 latente ("latent TGF-β binding protein", LTBP) formando un complejo conocido como LLC (long latent complexes) (Figura 1). Finalmente, TGF-β_1 es liberado de LAP y de LTBP por diferentes factores, tales como pH acido, el corte proteolítico por trombospondina/plasmina o la unión de la secuencia RGD de LAP del complejo latente al receptor de integrina $\alpha v\beta 6$ (el cual se ha detectado exclusivamente en las células epiteliales de pulmón). También se reconoce que TGF-β_1 puede ser activado mediante enzimas como la neuranimidasa (NA) bacteriana y vírica (Figura 2) [4, 5].

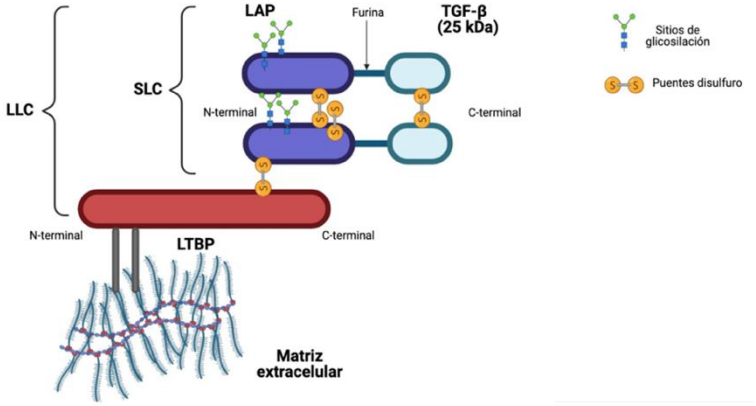


FIGURA 1. ESTRUCTURA DE TGF-β Y SU ASOCIACIÓN CON LAP Y LTBP.

TGF-β_1 es una citocina que se secreta de forma inactiva y se asocia con proteínas de la matriz extracelular, esta citocina puede ser activada tan pronto exista una demanda de la misma para un efecto autocrino ó paracrino. Tomada y modificada de [1, 4].

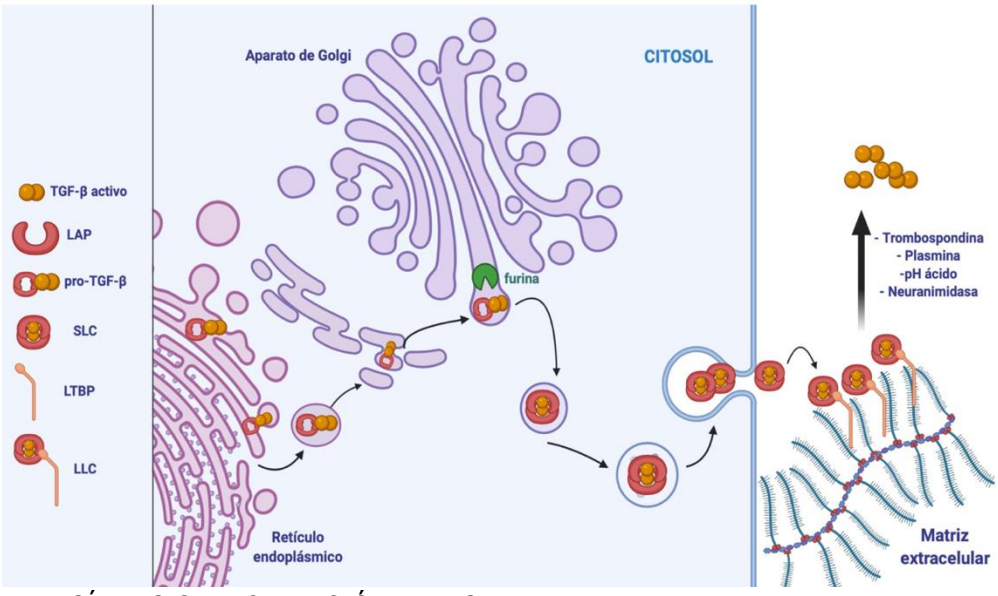


FIGURA 2. SÍNTESIS Y ACTIVACIÓN DE TGF-β_1.

TGF-β_1 pasa por la vía secretoria y es secretada como una proteína inactiva asociada a las proteínas de unión al péptido de latencia y asociada a la matriz extracelular. Bajo diversas condiciones, cambios de pH, actividad de la trombospondina o por enzimas bacterianas o víricas, TGF-β1 pasa de ser una citocina inactiva a una proteína activa [1, 4].

I.1.2 RECEPTORES PARA TGF-β_1.

TGF-β_1 ejerce sus funciones celulares gracias a la interacción con un complejo macromolecular constituido por dos proteínas de membrana con un dominio intracelular de cinasa serina-treonina (Ser-Thr), TβRI o ALK-5 (54 kDa) y TβRII (65 kDa) [6]. Estas proteínas están ampliamente presentes en prácticamente todos los tipos celulares, aunque su expresión está fuertemente regulada y su deficiencia conlleva procesos patológicos.

TβRI y TβRII se encargan de la transducción de señales una vez que TGF-β se une a ellos. Una diferencia importante entre ambas proteínas es que TβRII es una cinasa constitutivamente activa, mientras que TβRI es activado por fosforilación realizada por el receptor II: cuando TGF-β se une al receptor II, ocasiona la transfosforilación del sitio GS (Glicina-Serina) en el receptor I y la consecuente activación del dominio cinasa Ser-Thr del receptor I, lo que conlleva a que TβRI y TβRII se asocien formando un complejo hetero-tetramérico [1].

TβRI y TβRII no solo sufren modificaciones pos-traduccionales por fosforilación, también pueden sufrir modificaciones por ubiquitinación, lo que puede proporcionarles estabilización y regulación de la degradación

de TβRI por el proteosoma [7]. La sumoilación es otra modificación post-traduccional que facilita el reclutamiento y fosforilación de SMAD3 por parte del receptor I, TβRI. Finalmente, la presencia en la membrana de los receptores para TGF-β también puede regularse mediante su internalización dependiente de clatrina o por otras vías endocíticas dependientes de balsas lipídicas [8].

Otras dos proteínas que se encuentran en la superficie celular son el betaglicano y la endoglina, las cuales son consideradas como correceptores y aunque no tienen un dominio intracelular de cinasa, también unen al TGF-β y podrían regular el acceso del ligando a sus receptores en ciertos tipos celulares. El betaglicano, también llamado el receptor tipo III, une a todas las isoformas del TGF-β y juega un papel selectivo al facilitar la interacción de la isoforma TGF-β_2 con el receptor TβR-II [4, 9, 10].

I.1.3 SEÑALIZACIÓN.

Como ya se mencionó de manera previa, la forma dimérica bioactiva de TGF-β_1, permite que los receptores puedan asociarse entre sí formando una estructura hetero-tetramérica, lo que asegura la correcta conformación de los dominios cinasa de ambos receptores para activar las vías de señalización que a continuación se describen.

I.1.4 VÍA CANÓNICA DE TGF-β_1.

La vía de activación intracelular más conocida para esta citocina (también conocida como vía canónica) es la que se caracteriza por la fosforilación de las proteínas intracelulares llamadas Smad.

Estas proteinas intracelulares son activadas directamente por fosforilación en residuos de serinas por los receptores para TGF-β_1. Las proteínas Smad se han clasificado en 3 subfamilias de acuerdo a sus propiedades estructurales y funcionales:

R-Smad: también se les identifica como Smads activadas por el receptor, siendo Smad-2 y Smad-3 las que son activadas por TGF-β_1.

Co-Smad: Se encuentra conformada por Smad-4, que se une a las R-Smad para poder ingresar al núcleo como factores transcripcionales.

I-Smad: también conocidas como Smad inhibitorias, a la cual pertenece Smad-7 y que controla de forma negativa la vía de señalización activada por las R-Smad y TGF-β_1.

Las proteínas co-Smad, son proteínas globulares con dos dominios muy conservados denominados MH1 (N-terminal) y MH2 (C-terminal). Estos dominios se encuentran conectados por una región de unión

denominada “linker”, la cual es rica en residuos de prolina y serina de longitud variable.

El dominio MH1 se caracteriza por ser la región de la proteina Smad que se une al surco mayor del ADN. MH1 interacciona con otras proteínas nucleares como por ejemplo factores de transcripción, tales como ATF-2, c-jun o TFE; también regula el importe nuclear ya que contiene una señal de localización nuclear (NLS) y modula la transcripción de diversos genes.

Por otro lado, el dominio MH2 favorece la asociación específica de Smad al receptor de tipo I, y posee el sitio de fosforilación necesario para la activación de la vía canónica para TGF-β_1 y regula la oligomerización de las R-Smads y co-Smad y factores de transcripción [3, 11].

Las proteinas I-Smad carecen del dominio MH1 sin embargo, poseen el dominio MH2 que les permite competir con las R-Smads para interaccionar con el receptor TβRI, evitando su fosforilación por el dominio cinasa del receptor I. Sin embargo, no es la única forma de regular la vía de activación canónica de TGF-β_1, I-Smad puede facilitar la ubiquitinación del receptor de tipo I, al reclutar a las proteínas Smurf1 y Smurf 2 [1, 3, 6, 12].

Como se describió antes, una vez liberado del péptido de latencia, TGF-β_1 se une al receptor tipo II, y este a su vez, activa la actividad del dominio cinasa del receptor I. Este hecho, permite que el receptor fosforile a las proteínas Smad-2 y Smad-3 en sus residuos de Serina localizados en el extremo C-terminal del dominio MH2. Esta modificación postraduccional ocasiona un cambio estructural de la proteína Smad fosforilada, permitiendo que interactúe con la proteína Co-Smad (Smad-4) formando un complejo heterotrimérico. Este evento constituye un requisito para que el complejo de señalización pueda entrar al núcleo celular y pueda desempeñar un efecto de transactivación sobre un espectro amplio de genes, que permiten generar los efectos celulares de la citocina [13, 14]. La asociación de factores de transcripción al complejo ADN-Smads aportan especificidad y alta afinidad a la unión, ya que la interacción con co-activadores y co-represores determinan el efecto transcripcional.

Finalmente la regulación de la vía de señalización canónica para TGF-β_1 se debe a un mecanismo de retroalimentación negativo por parte de la expresión de Smad-7, interactuando con Smad-2 y Smad-3 y compitiendo por el sitio cinasa del receptor tipo I ó con Smad-4. Además la interacción de Smad-7 con los receptores TβRI y TβRII da como resultado la ubiquitinación y degradación de estas proteínas de membrana bloqueando de manera eficiente la vía de señalización canónica de TGF-β1, siendo Smad-7 uno de los genes de respuesta temprana a esta vía de señalización (Fígura 3a).

a) b)

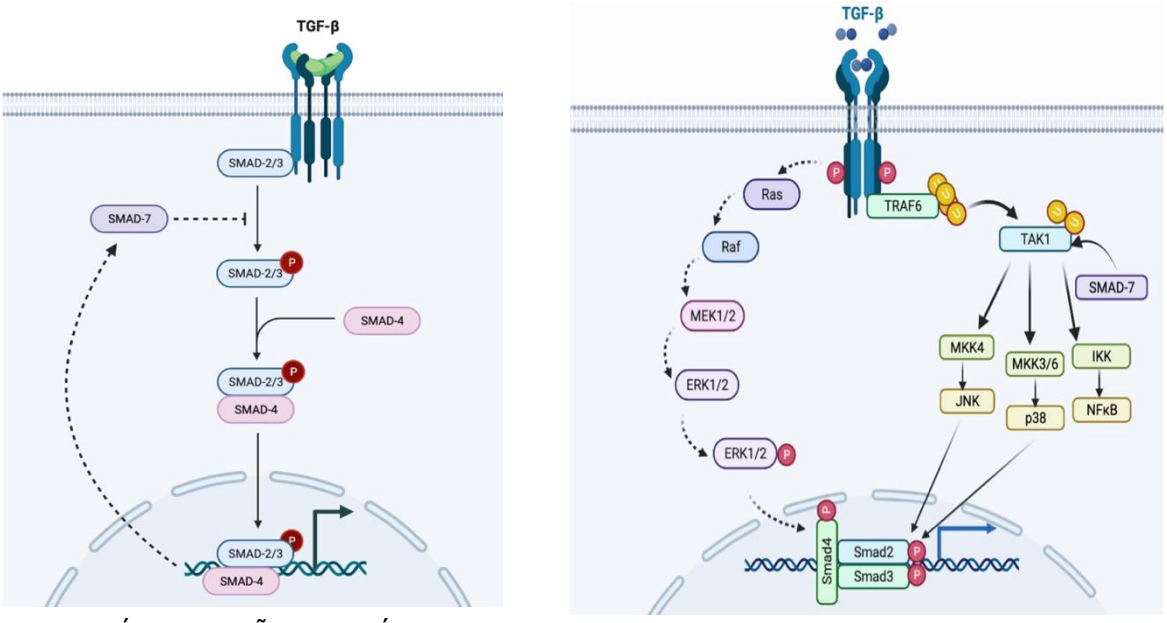


FIGURA 3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR TGF-β_1.

a) Vía canónica de TGF-β_1, dependiente de la activación por fosforilación de las proteínas Smad. b) Vía independiente de Smad, proteínas de la familia de MAP cinasas pueden ser activadas por los receptores para TGF-β1 [1, 3].

I.1.5 VIA NO CANÓNICA O INDEPENDIENTE PARA TGF-β_1.

Varios estudios han evidenciado que TGF-β_1 induce otras señales intracelulares no dependientes de Smads, donde se involucran proteínas como MAPKs (ERK 1 / 2, JNK, p38), o Ras, así como los complejos de iniciación de la traducción como eIF2 y eIF3, cuyos mecanismos no se conocen con certeza (Figura 3b) [15].

La activación de estas vías parece ser más importante en los efectos del TGF-β_1 relacionados con la regulación de la síntesis de la matriz extracelular. TGF-β_1 puede activar a TAK-1, una cinasa de residuos de serina y treonina, que pertenece a la familia de las MAP cinasas. Además, Rac y Ras, miembros de la familia de proteínas G pequeñas, han sido también implicadas en la señalización del TGF-β_1. En ciertos tipos celulares, ciertas MAPKs, incluyendo las cinasas reguladas por señales extracelulares como ERK1 y 2, las cinasas activadas por estrés como SAPK/JNK y la PI3- K, son también activadas por el TGF-β_1. Las Smads tienen además una importante función como integradoras de señales de múltiples vías de señalización. En ese sentido, se ha reportado que cinasas como las ERKs (MAPKs), la proteína cinasa II

dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CamKII) y la proteína cinasa C (PKC) pueden fosforilar a las Smads en diferentes regiones del dominio "linker", evitando en algunos casos su acumulación nuclear y en otros su unión con el ADN, por lo tanto, modulando así su actividad (Figura 3b). Aunque resulta un proceso bastante complejo, se reconoce que la integración de señales intracelulares activadas por TGF-β_1 son importante para explicar diversos procesos patogénicos, como inflamación, autoinmunidad, cáncer, fibrosis y metástasis [1, 11, 13-15].

I.1.6 FUNCIONES DE TGF-β_1.

Desde una perspectiva inmunológica, el TGF-β_1 es una citocina pleiotrópica que participa en el fortalecimiento de la homeostasis y la tolerancia inmune, regulando la expansión celular, la memoria y la función de muchos componentes del sistema inmunológico [16]. Las alteraciones en la señalización de TGF-β_1 son la base, por ejemplo, de muchas enfermedades inflamatorias y en el desarrollo de tumores y cáncer, ya que las alteraciones desde los niveles en la expresión y activación de los receptores y de las vías de señalización dependientes de esta citocina, pueden desencadenar patologías crónicas. Algunos autores han denominado este efecto como el "lado obscuro del TGF-β_1", ya que algunos estudios revelaron que esta citocina tiene un papel funcional en la evasión inmunitaria tumoral [17].

TGF-β_1 es una citocina involucrada en una amplia gama de funciones celulares que incluyen, entre varias otras, al crecimiento celular, proliferación, diferenciación y muerte. Se sabe que la vía de señalización canónica del TGF-β_1 tiene un papel central en la inducción de procesos fibróticos al promover la EMT, la proliferación y diferenciación de fibroblastos. Se ha demostrado que TGF-β_1 induce fibrosis pulmonar activando vías dependientes e independientes de Smad, aumentando directamente la transcripción de genes ECM, principalmente colágeno, elastina y fibronectina que se depositan en la matriz extracelular y limitando la capacidad respiratoria. En el contexto respiratorio, una falla en la regulación de producción de proteinas de ECM puede generar patologías asociadas al desarrollo de pulmones, fibrosis pulmonar, enfermedad crónica obstructiva (COPD) y enfermedad vascular pulmonar, en este contexto, se ha demostrado que Smad-3 puede desempeñar un papel importante [18].

I.1.7 TGF-β_1 EN EL CONTEXTO DE INFECCIONES POR MICROOGANISMOS.

Así como TGF-β_1 interviene en la homeostasis de la respuesta inmune a diferentes niveles, también participa en la respuesta frente a las infecciones por microorganismos. Una gran cantidad de evidencias sugieren que TGF-β_1 controla la interacción entre el patógeno y su hospedero, modulando las diferentes fases de la patogénesis y jugando un papel importante en la respuesta inflamatoria y la resolución a la infección, así como en la reparación de tejidos.

En el contexto de infección por patógenos, TGF-β_1 puede regular la magnitud y el tipo de respuesta contra los microorganismos, así como mantener la tolerancia inmunológica contra antígenos propios y extraños en condiciones normales [1, 16, 19].

Resulta importante señalar que muchos patógenos utilizan y explotan en varias formas a TGF-β_1 para su ingreso a la célula hospedera, su replicación y su permanencia en el hospedero, ya sea utilizando la plataforma de TGF-β_1 (hablando de sus receptores, la vía de señalización que activa, la activación y represión de genes y la secreción de TGF-β_1), o también controlando la respuesta inmune. Por ejemplo, la secreción y activación de TGF-β_1 por parte de células epiteliales puede reducir la respuesta inmune de algunos tipos celulares como los macrófagos, favoreciendo la proliferación intracelular del patógeno y su virulencia. *Trypanosoma cruzi* utiliza a los receptores TβRI y TβRII para ingresar a la célula hospedera, ya que células epiteliales que carecen de estos receptores de membrana mostraron ser resistentes a la infección por *T. cruzi*, mientras que la infectividad se restauraba en presencia de los receptores expresados por transfección [20]. Además, el tratamiento con TGF-β_1 de macrófagos humanos y murinos bloquea la acción de INF-γ lo que favorece el crecimiento de *T. cruzi* mientras que, ratones que se trataron con TGF-β_1 mostraron una mayor cuantificación de parásitos y mayor mortalidad, comparados con los ratones control, lo que sugiere que *T. cruzi* utiliza a esta citocina para inhibir la respuesta inmune que controla su tasa de crecimiento [21].

Es por ello, que el papel de esta citocina en la resolución o exacerbación de la infección, depende de la naturaleza de la respuesta inmune necesaria para controlar la replicación y la enfermedad generada por el patógeno, es por esta razón que la respuesta asociada a esta citocina se le ha considerado como el “yin-yang de la respuesta inmune” [1].

Considerando lo anterior, se sugiere que la forma y la vía mediante la cual un patógeno infecta al hospedero, modula el tipo de respuesta inmunológica. Bajo este contexto, la respuesa inmune por mucosas activada por la secreción de IL-6, IL-23 y TGF-β_1 activa la inmunidad tipo Th17 favoreciendo la resolución de la infección por el microorganismo. Por ejemplo, cuando se infectan ratones por vía oral

con *Yersinia enterolitica* se activa la señalización vía TLR2/TLR1 induciendo la respuesta Th17, mientras que la infección sistémica por este microorganismo activa la respuesta tipo Th1 [22]. También se ha demostrado que cuando no existe producción de citocinas inflamatorias y hay sobre-producción de TGF-β_1 por células intestinales, los linfocitos T no se activan de manera correcta en infecciones por *Helicobacter pylori* [23], por lo que en este contexto es importante señalar que la respuesta inflamatoria favorece la resolución de la infección.

En la infección por malaria, por ejemplo, TGF-β_1 es activado reduciendo la carga parasitaria y la enfermedad causada por *Plasmodium sp.* Además en este contexto, se ha demostrado que cuando TGF- β_1 participa de la diferenciación los linfocitos T CD4$^+$ hacia células Treg se eleva la tasa de crecimiento del parásito en humanos. Por el contrario, mientras que la inhibición de la actividad de TGF-β_1 da como resultado una respuesta más robusta por parte de los linfocitos T CD8$^+$, así como también protección en los ratones que se reinfectan con malaria [21, 24].

Existen numerosos ejemplos en los que el efecto protector o supresor de TGF-β_1 depende del contexto inmune del hospedero. En la infección por *Candida albicans*, un hongo oportunista causante de la mortalidad de pacientes inmunocomprometidos, la respuesta tipo Th1 y la producción de IFN-γ es importante para la resolución de la enfermedad, sin embargo en pacientes inmunocomprometidos la actividad local TGF-β_1, reduce la respuesta del hospedero [25].

I.1.8 TGF-β_1 EN EL CONTEXTO DE INFECCIONES POR VIRUS.

En el contexto de infecciones virales, TGF-β_1 puede proteger en contra de la patología asociada a infecciones agudas, sin embargo, en infecciones crónicas tiene un efecto perjudicial sobre la inmunidad mediada por células T. Por ejemplo, en la infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica crónica (LMCV), la presencia de TGF-β_1 y la activación por fosforilación de Smad-2, mostraron ser un punto clave de la respuesta de las células T CD8$^+$ durante las infecciones virales crónicas *in vivo*. Esta evidencia mostró que los linfocitos T CD8$^+$ de ratones infectados con dos cepas distintas de LMCV presentaron una mayor fosforilación de la proteína Smad-2 y la presencia de la proteína pro-apoptótica Bim, sugiriendo una respuesta reducida por Linfocitos T CD8$^+$ en infecciones crónicas. Además, ratones TβRIIdn no mostraron la presencia de la proteína Bim bajo las mismas condiciones de estudio de infección por LMCV [26]. Es importante señalar, que en este contexto TGF-β_1 es una citocina insuficiente para la eliminación del virus.

Algunas proteínas de virus inducen la producción y secreción de TGF-β_1, como ocurre con la proteína no

estructural NS4 del virus de hepatitis C (HVC) [27]. En este contexto, se observó un aumento en la secreción de IL-17, IFN-γ, IL-10 y TGF-β_1, lo que sugiere que la infección por HCV induce respuesta de evasión de la respuesta inmune al inhibir las respuestas tipo Th1 y Th17. Esta información se correlaciona con estudios en pacientes infectados con el virus de hepatitis B o C, donde los niveles de TGF-β_1 están incrementados con respecto a individuos sanos, lo cual contribuye, adicionalmente, en el desarrollo de fibrosis hepática [28-30]. Además pacientes que poseen polimorfismos en el gen *tgfb*, presentan una mayor cantidad de TGF-β_1 en plasma, lo que se ha relacionado con un peor desenlace frente a infecciones por hepatitis C [31].

En la infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana) el desarrollo de la enfermedad se puede correlacionar con los niveles de TGF-β_1 [32]. Se sabe que esta citocina induce la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en macrófagos, favoreciendo el tropismo del virus hacia este tipo celular y los linfocitos T $CD4^+$ [33]; además *in vivo*, los monocitos productores de TGF-β_1 inducen la apoptosis de linfocitos T $CD4^+$ [34]. Sin embargo, la infección por VIH de linfocitos Treg inhibe la expresión de Foxp3 y la secreción de TGF-β_1,incrementando la producción de IL-4, lo que pudiera explicar por que algunos pacientes con VIH presentan inflamación crónica en diversos tejidos [35].

Esta información sugiere que los virus han seleccionado mecanismos que alteran la expresión, producción, secreción y activación de TGF-β_1, regulando así tanto la respuesta celular como la respuesta inmunológica. Por todo esto consideramos que es importante identificar cuales son los mecanismos celulares bajo los cuales pudieran llevar a cabo este control.

Se ha identificado, que los virus pudieran utilizar 4 estrategias de la vía de señalización de los factores de crecimiento celular, entre ellos TGF-β_1, para favorecer el proceso infectivo y la generación productiva de progenie viral [36] (Figura 4). Estas cuatro estrategias son:

1. Control de la secreción y activación de TGF-β_1 a partir de su forma latente.
2. Regulación de la presencia de los receptores para TGF-β_1 (TβRI y TβRII) en membrana.
3. Activación o inhibición de las vías de señalización activadas por TGF-β_1.
4. Interacción de proteínas virales con los receptores TβRI y TβRII o con proteínas Smad.

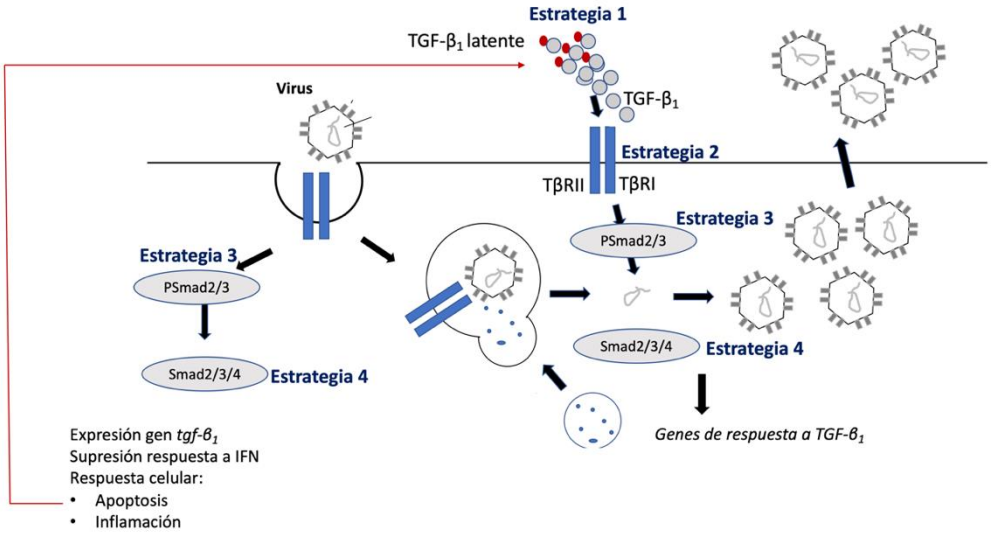


FIGURA 4. CONTROL DE LA RESPUESTA POR TGF-β_1 UTILIZADA POR LOS VIRUS.

Se ha identificado que los virus utilizan diferentes estrategias a su favor para controlar la maquinaria celular. Podemos establecer 4 estrategias que les permiten controlar la respuesta celular y como consecuencia la respuesta inmune para establecer con éxito su ciclo replicativo e infectivo a diferentes niveles en la respuesta y señalización por TGF-β_1. *Tomado y modificado de* [37].

Estrategia 1. Muchos virus inducen la producción y secreción de TGF-β_1 en su forma latente, activándose bajo diversas condiciones dependiendo del contexto celular y estimulando una respuesta de tolerancia inmune [16].

Estrategia 2. Aunque no se ha reportado que los receptores para TGF-β_1 participen como vía de entrada a la célula hospedera, la estimulación de los receptores para esta citocina están relacionados con la modulación de la replicación del virus. En este contexto, existen varios ejemplos donde los virus controlan la presencia de los receptores en la membrana plasmática. Por ejemplo, en la infección con el virus sincitial respiratorio (RSV), los receptores para TGF-β_1 favorecen la replicación del virus [38]. Por otro lado, se ha reportado que el receptor TβRII es indispensable para la reactivación del virus Eipstein-Bar ya que su ausencia, inhibe la apoptosis a través de las vías de señalización activadas por TGF-β_1; señales necesarias para la reactivación de este virus en células epiteliales [39]. Por otro lado, la proteína E5 del virus del papiloma humano reduce la expresión de TβRII lo que genera una reducción de la fosforilación de Smad-2 y su translocación junto con Smad-4 al núcleo, evento que pudiera desempeñar un papel importante en la carcinogéneses de cáncer cervico-uterino inducido por VPH [40].

En la infección con adenovirus de células A549, se redujo la presencia del receptor TβRII tanto de la proteina, mediante un mecanismo dependiente de la proteína E1A. Por otro lado, el pre-tratamiento de TGF-

β_1 redujo la abundancia relativa de proteínas estructurales de adenovirus en las células infectadas, un efecto que se potenció cuando las células se infectaron con mutantes incapaces de modular la vía de señalización de TGF-β_1. Estos resultados plantean la posibilidad de que la inhibición de la señalización de TGF-β_1 por E1A sea un mecanismo mediante el cual el adenovirus contrarresta las defensas antivirales del huésped [41].

En un modelo murino de infección *in vivo* por reovirus aumenta la expresión de receptor I de TGF-β_1 (TβRI), lo cual incrementa, a su vez, la fosforilación de Smad-3. Además, en este modelo se propuso que la señalización de TGF-β_1 tuvo efecto neuroprotector, ya que el uso de un inhibidor para TβRI aumentó la muerte de las neuronas infectadas como una respuesta protectora del sistema inmune innato [42].

Estrategia 3. Toda vez que la presencia y la regulación de los receptores para TGF-β_1 es importante, la respuesta de señalización activada define tanto el destino de la replicación del virus como la respuesta celular inmune que ayude a la resolución de la infección y el desarrollo de la enfermedad causada por el virus. En el caso de la infección por coronavirus MERS, la muerte por apoptosis *in vitro* de células epiteliales de pulmón Calu-3 parece estar relacionada con un aumento en la presencia de Smad-7 [43]. En SARS-CoV, la proteína de Nucleocápside (N) interacciona con la proteína Smad-3 interfiriendo con su asociación con Smad-4 y bloqueando la apoptosis inducida por la infección en células HPL-1 [44]. Por su parte, el análisis por inmunohistoquímica de muestras de pacientes con infección con este coronavirus mostró que la asociación de la proteína N con Smad-3 activa la expresión de la proteína PAI-1 (proteína de activación de plasminógeno) que se relaciona con el desarrollo de fibrosis pulmonar causada por la infección [44]. Estos hallazgos proporcionan evidencia de un mecanismo por el cual una proteína viral puede modificar la señalización del TGF-β_1 y así bloquear la apoptosis de las células infectadas con el SARS-CoV, promoviendo la fibrosis tisular. La proteína Plpro (papain-like protease) de SARS-CoV estimula la expresión de colágeno tipo I dependiente de TGF-β_1, a través de la activación de STAT-6, en modelos de cultivo *in vitro* e *in vivo,* lo que pudiera relacionarse con el desarrollo de fibrosis pulmonar después de la infección por este virus respiratorio [45].

Estrategia 4. Como se describió antes, en respuesta a la presencia de TGF-β_1 se lleva a cabo la activación de un amplio abanico de genes, por lo que es importante identificar los posibles blancos en el ADN que participen en la respuesta frente a la infección. Por ejemplo, el sarcoma de Kapossi (KS) es el resultado de una infección con un virus herpes gamma, conocido como herpervirus tipo 8 asociado con el sarcoma de Kaposi (KSHV). La infección por KSHV comprende 2 fases: latentes y líticas, cuyas

propiedades transformadoras se derivan principalmente de la expresión de genes latentes como la kaposina, microARN virales, proteína inhibidora de la enzima convertidora de IL-1β del dominio de muerte viral de Fas (vFLIP), ciclina viral (vCyc) y antígeno nuclear asociado a la latencia (LANA). La desregulación de la señalización de TGF-β_1 contribuye de manera importante a la sobrevivencia y proliferación celular en la infección por KSHV. Además, una proteína lítica de KSHV interfiere con la señalización de TGF-β_1: la proteína viral factor de regulación de interferon-1 (vIRF-1) a través de interaccionar de forma directa con Smad-3 y Smad-4 impide su unión al ADN para la transactivación de genes que contribuyan con el arresto celular [46].

Las estrategias anteriores sugieren, que TGF-β_1 podria ser un objetivo crítico de los virus, ya que las patologías asociadas a la enfermedad causada por estos patógenos puede involucrarse en la fibrosis pulmonar inducida por la infección, las enfermedades renales y otras complicaciones asociadas a la respuesta inmune exacerbada causada por la resolución de la infección. Dos eventos importantes regulados por TGF-β_1 que son modulados por la mayoría de los virus son la proliferación celular y la inducción de fibrosis. Por lo tanto, como una vía fundamental modificada por los virus, la señalización de TGF-β_1 debe evaluarse como un objetivo terapéutico apropiado. De modo que los anticuerpos TGF-β_1, los oligonucleótidos antisentido y las moléculas pequeñas que se dirigen al TGFβRI han demostrado potenciales terapéuticos [47, 48].

I.2 INFLUENZA

Durante siglos, las epidemias de influenza han asolado al hombre y hoy en día, sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y grandes segmentos de la población humana se ven afectados cada año.

Los virus de influenza cambian constantemente, por lo que no es inusual que aparezcan nuevos virus cada año. Los casos de influenza ocurren regularmente durante los meses fríos de cada año y se conocen como epidemias o brotes de influenza estacional. Para estudio, los virus de influenza se clasifican en cuatro tipos: A, B, C y D. Los virus de influenza tipo A (IAV) son zoonóticos, ya que infectan una amplia variedad de aves y mamíferos y se dividen en subtipos. Estos virus han sido causantes durante el siglo pasado de tres pandemias, como se les conoce a las epidemias que se extienden a más de un continente. Los virus de influenza B, sólo infectan humanos y tienen un bajo potencial de causar pandemias, aunque pueden provocar enfermedades respiratorias serias. Los virus de influenza C, infectan a humanos y cerdos, causan enfermedades respiratorias leves y han sido poco estudiados, mientras que los virus de influenza D afectan

principalmente al ganado y no se cree que puedan causar infecciones o enfermedades en los seres humanos [49].

Los virus de influenza pertenecen a la familia de los *Orthomyxoviridae* y son virus con genomas de ARN segmentados de sentido negativo y monocatenarios [50]. Los virus de influenza A y B poseen 8 segmentos de ARN, que codifican para las subunidades de ARN polimerasa, glicoproteínas virales hemaglutinina (H ó HA) con sus distintas estructuras globulares de 'cabeza' y 'tallo', que facilitan la entrada del virus, y neuraminidasa (N ó NA), que facilita la liberación viral, nucleoproteína viral (NP), proteína de matriz (M1) y proteína de membrana (M2), la proteína no estructural NS1 y la proteína de exportación nuclear (NEP ó NS2) (Figura 5). Las proteínas virales HA y NA son las más variables antigénicamente y, en el caso del virus de la influenza A, se clasifican en subtipos antigénicamente diversos. Estas dos glicoproteínas virales se encuentran en la superficie de la partícula del virus y son los principales objetivos de los anticuerpos protectores inducidos por la infección y la vacunación por el virus de la influenza. Los virus de influenza C y de influenza D tienen solo siete segmentos de ARN y no parecen causar una enfermedad sustancial en los seres humanos. Sin embargo, las infecciones por el virus de la influenza C pueden causar enfermedades similares a la influenza y hospitalizaciones en algunos casos, especialmente en niños [51].

Para los virus de influenza A existen 18 subtipos de hemaglutinina y 11 subtipos de neuraminidasa diferentes (de H1 a H18 y de N1 a N11, respectivamente). Si bien existen potencialmente 198 combinaciones del subtipo de influenza A, sólo se han detectado 131 subtipos por naturaleza. Los actuales subtipos de virus de influenza A que circulan habitualmente entre las personas son: A(H1N1) y A(H3N2) desde 1977, junto con virus de influenza B. Los virus de influenza B no se dividen en subtipos, pero en cambio se clasifican en dos linajes: B/Yamagata y B/Victoria. La frecuencia de estos tres grupos de virus varía de manera temporal y geográfica.

Las cepas del virus de la influenza se nombran de acuerdo con su tipo, la especie de la cual se aisló el virus (omitido si es humano), la ubicación del aislado, el número del aislado, el año de aislamiento. Por ejemplo, el virus del subtipo H5N1 aislado de pollos en Hong Kong en 1997 es: virus influenza A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1).

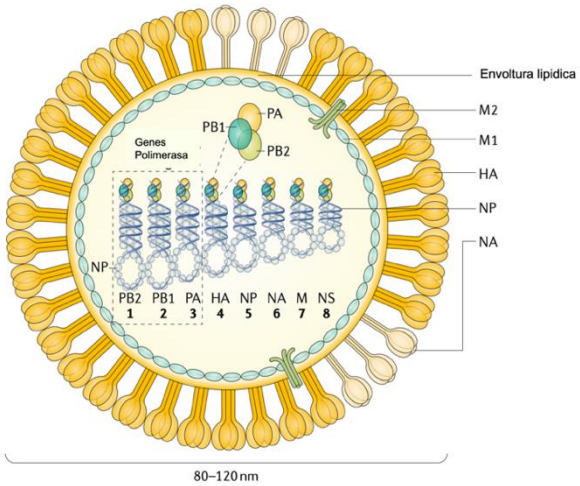


FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE INFLUENZA A.

Representación de una partícula o virión del virus de la influenza A. El virus de influenza A es un virus envuelto de ARN de cadena sencilla y sentido negativo, su genoma comprende ocho segmentos de ARN monocatenarios ubicados dentro de la partícula del virus, con una longitud de 890 a 2341 nucleótidos que codifican para 12 proteinas virales funcionales. Tomado y modificado de [52].

Se sabe que varias comorbilidades aumentan el riesgo de infección letal por el virus de la influenza. El embarazo y la edad son factores de riesgo conocidos, siendo que niños menores a 1 año y las personas mayores (> 65 años) son las poblaciones vulnerables. Aunque la mortalidad es baja en niños, se ha registrado un número considerable de muertes debido a la infección por IAV en individuos jóvenes sin factores de predisposición conocidos. La gravedad a la enfermedad causada por la infección por el virus de influenza y/o la mortalidad, se deben en general a una neumonía inducida por el virus o a una super-infección bacteriana secundaria a la infección. La neumonía viral primaria se caracteriza por altos niveles de replicación viral en el tracto respiratorio inferior acompañada de fuertes respuestas pro-inflamatorias, también conocida como tormenta de citocinas [53].

Durante la pandemia de 2009 con influenza A H1N1, la obesidad mórbida (IMC>35-40 kg/m^2) se reconoció como un factor de riesgo importante [54], ya que se asocia una replicación excesiva de IAV, una mayor gravedad de las infecciones bacterianas secundarias y una menor eficacia de la vacuna en pacientes con obesidad [55]. Por último, el papel de los factores genéticos del hospedero en la enfermedad sigue siendo poco estudiado, pero se ha demostrado que los polimorfismos y las mutaciones sin sentido en varios genes del huésped (como IFITM3 e IRF7, que codifican genes implicados en la vía del interferón) y que participan en la respuesta inmune innata frente al virus, predisponen a la enfermedad grave por IAV [56].

I.2.1 VARIACIÓN ANTIGÉNICA Y ZOONOSIS.

Los virus de influenza pueden escapar a la respuesta inmune del hospedero gracias a las variaciones antigénicas en sus proteínas H y N [57]. A diferencia de otros virus respiratorios, los virus de influenza tienen dos mecanismos de variación antigénica: “genetic drift” y “genetic shift” (Figura 6).

“Genetic drift” es causado por mutaciones puntuales, cambios en nucleótidos individuales, causados durante la replicación del genoma viral, ya que la ARN polimerasa del virus genera con mayor frecuencia errores en la copia de los segmentos de su genoma viral. La replicación del virus resulta en una tasa de mutación de mutación de aproximadamente un cambio por cada genoma copiado (7.3×10^{-5} mutaciones/nucleótido copiado) [58].

En los virus de influenza A, los genes HA, NA y M2, presentan una tasa de evolución diferente, con respecto a los demás segmentos, lo cual refleja la diferente presión de selección por parte del hospedero para cada proteína del virus. Se ha calculado que la tasa de evolución, es decir, la fijación de mutaciones de las proteínas HA y NA es alrededor del 1% anual. Estos cambios en las proteínas de superficie del virus generan que el sistema inmune de las personas previamente infectadas con un virus en particular ya no reconozca a las proteínas HA y NA de este nuevo virus. Esto último es la razón por la que cada año se revisa la composición de los tipos de virus que se incluirán en la vacuna estacional [59, 60].

Por otro lado, “genetic shift” se facilita cuando dos virus de diferentes subtipos de HA y NA infectan a un mismo organismo, y en la misma célula infectada, los genes de ambos virus pueden mezclarse y producirse nuevos virus, conocidos como re-arreglantes por haber experimentado un re-arreglo de genes, con combinaciones de H y N diferentes a la de los virus originales. Este es un cambio antigénico brusco que puede resultar en la introducción de un nuevo subtipo de HA y/o de NA en la población humana. Cuando esto sucede, los nuevos subtipos de HA y/o NA pueden representar proteínas inmunológicamente diferentes a la de las cepas que estaban en circulación. Si este fuera el caso, usualmente se da una alta incidencia de infección en la población que no tiene anticuerpos contra la nueva cepa de virus, generándose potencialmente una pandemia, como ocurrió de forma reciente, en el 2009 (Figura 6).

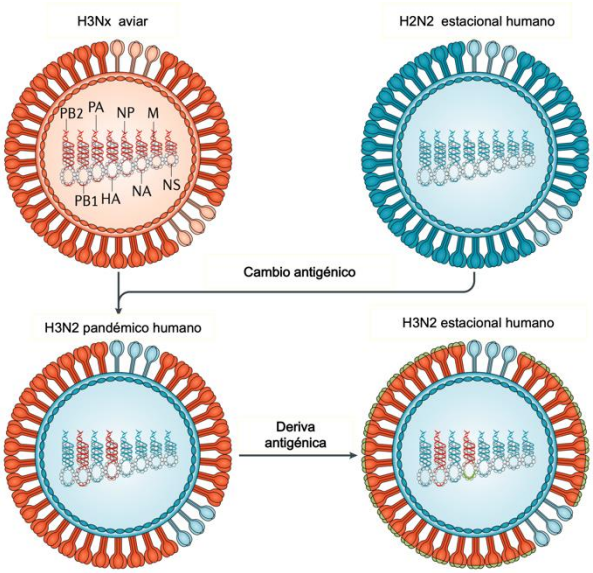


FIGURA 6. CAMBIO Y DERIVA ANTIGÉNICA.

Un ejemplo del significado de "genetic shift" y "genetic drift" es el representado en esta figura. En 1968, las coinfecciones entre un virus de influenza aviar A H3Nx (donde x = 1–9) y los virus de influenza humana A H2N2 estacional dieron como resultado el intercambio de segmentos virales (reordenamiento) y la selección del virus pandémico de influenza humana A H3N2 , con la ARN polimerasa PB1 y segmentos de ARN de hemaglutinina (HA) derivados del virus aviar y el resto de segmentos derivados del virus humano. La falta de inmunidad preexistente a el H3, una proteina HA antigénicamente novedoso en humanos que facilitó la transmisión humana. Se han llevado a cabo procesos similares de reordenamiento durante otras pandemias del virus de la influenza A. Una vez que el H3N2 se estableció en los seres humanos, el virus comenzó a desplazarse, como es el caso de todos los demás virus de la influenza estacional humana. Durante la deriva, se seleccionan pequeños cambios antigénicos en la proteína HA generados por la mutación para aumentar la evasión de la respuesta inmune, aunque no tan dramáticamente como con el cambio antigénico. Tomado y modificado de [52].

El principal reservorio de diversas cepas y subtipos del virus de la influenza A son las aves silvestres, especialmente los patos y gansos migratorios. De hecho, los patos domésticos criados en estanques abiertos son los intermediarios entre los reservorios de los virus de la influenza en las aves acuáticas silvestres y otras aves domésticas. La transmisión entre aves puede ocurrir directamente a partir de agua contaminada. Aunque la mayoría de los subtipos de influenza A causan infecciones asintomáticas en especies de aves, los subtipos H5Nx y H7Nx pueden evolucionar a cepas de mediana patogenicidad que permite la maduración de HA por las proteasas ubicuas del hospedador y la propagación del virus fuera de los epitelios respiratorios e intestinales a múltiples órganos, incluido el cerebro, y puede causar infecciones letales en pollos, pavos y algunas razas de patos domésticos. La transmisión de los virus de la influenza a múltiples especies de aves de corral domésticas ocurre a través de la denominada cría de traspatio, mediante la cual las especies se

crían juntas y en mercados de aves de corral vivas; la transmisión posterior a granjas avícolas comerciales puede ocurrir debido a la falta de bioseguridad y debido a la propagación viral a través de mercados vivos [61].

La influenza en cerdos es una enfermedad respiratoria similar a la influenza en humanos, con fiebre alta y neumonía causada por los subtipos de influenza A H1N1, H3N2 y H1N2. El intercambio de genes entre dos virus de diferente subtipo, generalmente provenientes de diferentes especies animales, se ven facilitados en los cerdos ya que, a diferencia de las aves, que generalmente no son infectadas por virus de influenza A de origen humano, y viceversa, los cerdos se pueden infectar con virus de origen aviar, humano y por supuesto, porcino. Así, cuando un cerdo se infecta al mismo tiempo con dos virus de diferentes especies, por ejemplo de patos y humanos, se convierte literalmente en un recipiente de mezclado de genes, en el cual pueden generarse nuevos virus [61, 62].

Se sabe que algunas cepas de IAV se transmiten por aerosol de humanos a cerdos y viceversa, incluida la cepa de influenza A H1N1 pandémica 2009 y la variante de influenza A H3N2 que se transmite de cerdos a niños. En los caballos, la infección causa enfermedades respiratorias y se transmite por aerosol; dos linajes de influenza A H3N8 son los principales responsables. En 2004, la cepa de influenza equina A H3N8 se propagó a los perros y en 2006 en Asia, también se detectó un virus de influenza A aviar H3N2 transmitido a perros [52, 63, 64].

En el siglo pasado aparecieron tres cambios antigénicos en los virus de influenza A, circulantes en humanos que fueron responsables de sendas pandemias: en 1918, con la aparición de un virus H1N1; en 1957, cuando el virus H1N1 fue reemplazado por un virus de subtipo H2N2; y en 1968, cuando un virus H3N2 reemplazó al subtipo H2N2. En 1977 reapareció el subtipo H1N1 en humanos, aunque en este último caso el virus H1N1 no resultó en una pandemia y no reemplazó al subtipo circulante H3N2, por lo que ambos subtipos (H1N1 y H3N2) co-circulan hasta nuestros días en todo el mundo y son los responsables de causar los brotes estacionales que se presentan cada año durante la temporada invernal. Las pandemias de 1957 y 1968 resultaron del intercambio de genes entre virus de origen humano y aviar. El origen del virus que causó la pandemia de 1918 es todavía controversial. La caracterización de la secuencia del genoma del virus reconstruido por métodos de ingeniería genética sugirió que éste había pasado directamente de aves a humanos [65]; sin embargo, datos recientes indican que los componentes genéticos de este virus pandémico circulaban en cerdos y en humanos desde 1911, por lo que parece poco probable que haya sido un virus de aves el que se haya introducido a la población humana poco antes de la pandemia de 1918 [52, 66].

Los estudios filogenéticos que se han llevado a cabo utilizando decenas de secuencias genómicas del virus A/H1N1/2009 aislados en diferentes partes del mundo, indican que este virus es de origen porcino, ya que sus genes han estado presentes en linajes de virus que han circulado en cerdos por al menos los diez últimos años [66-69]. El precursor inmediato del actual virus pandémico es un virus triple rearreglante que circula en la población porcina de Norteamérica y Eurasia, el cual adquirió los genes de la N y de la proteína M de un virus de cerdo Eurasiático [66-68].

Los virus de la influenza humana se transmiten por vía respiratoria, mientras que los virus de la influenza aviar en las aves silvestres se transmiten por las vías fecal-fecal, fecal-oral o fecal-respiratoria. Dependiendo de la ruta de transmisión, el virus se dirige a las células epiteliales del tracto respiratorio o intestinal para la infección y la replicación productiva. Además, algunos virus de influenza aviar A, especialmente los del subtipo H7, se han asociado con infecciones humanas del ojo y conjuntivitis. La gravedad de la infección en humanos se asocia con la replicación del virus en el tracto respiratorio inferior, que se acompaña de una inflamación grave debido a la infiltración de células inmunitarias.

I.2.2 ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA.

Los virus de influenza A tiene una apariencia pleomórfica al microscopio electrónico con un diámetro promedio de 100 nm. La partícula viral está envuelta por una bicapa de lípidos en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas HA y NA y menores cantidades de la proteína transmembranal M2, como ya se mencionó de manera previa. Al interior de la bicapa lipídica se encuentra una capa de proteína formada por la proteína de matriz M1, y en el interior de la estructura así formada está contenido el genoma viral. El genoma del virus recubre a la nucleoproteína NP, y además está asociado a la ARN polimerasa viral, la cual es un complejo proteíco formado por dos subunidades básicas (PB1, PB2) y una ácidica (PA) (ver Fígura 5).

En humanos, como ya se mencionó previamente, el virus normalmente ingresa al organismo por nariz o boca e infecta las células que recubren el tracto respiratorio, uniéndose a ácido siálico (AS) en la superficie de las células para iniciar la infección. El AS es una molécula muy abundante en todas las células, forma parte de cadenas de azúcares unidas a proteínas o lípidos y define el tropismo de los virus de influenza. Esto último depende de la afinidad diferencial entre la hemaglutinina y los diferentes tipos de enlaces glucosídicos del AS con el azúcar que los precede en la cadena de carbohidratos, que generalmente es galactosa (Gal). Los virus aislados de humanos, se unen preferentemente a AS en unión α-2,6 con la galactosa, mientras que los virus aviares se unen AS con unión α-2,3. Las células epiteliales que recubren la tráquea humana

tienen principalmente AS con enlaces α-2,6, mientras que las células epiteliales del intestino de aves acuáticas, que es donde se replica el virus en estos animales, tienen principalmente AS en enlace α-2,3 [70, 71]. Por su parte, en las células epiteliales de la tráquea de los cerdos existen ambos tipos de enlaces del AS, lo que favorece que el cerdo pueda ser naturalmente infectado tanto por virus porcinos como por virus de origen aviar y humano, lo que resulta, como se mencionó anteriormente, que en esta especie animal se puedan generar frecuentemente rearreglos genéticos que dan lugar a virus de influenza con combinaciones de segmentos génicos de diferentes orígenes.

Una vez dentro del organismo, la proteína HA del virus se une al residuo de AS, se internaliza en un endosoma y, posteriormente, este último se asociará con los lisosomas. A continuación y por un mecanismo dependiente de la proteína viral M2, el interior del endosoma se acidifica, lo que desencadena un cambio conformacional en la HA viral que produce la fusión de la envoltura viral con la del endosoma. La fusión da como resultado la liberación del contenido del virus, es decir los 8 segmentos de ARN en forma de complejos de ribonucleoproteínas (vRNP), en el citoplasma. Los vRNP se importan, posteriormente, al núcleo de las células infectadas, donde se produce la transcripción y replicación del ARN viral a través de las actividades enzimáticas del complejo de polimerasa viral unido a los vRNP. La replicación del ARN viral ocurre a través de un intermedio de sentido positivo, conocido como complejo de ribonucleoproteína complementaria (cRNP). La transcripción del ARN viral da como resultado ARNm de hebra positiva a los que se les añade en su extremo 5´, 5-metil-guanosina (cap) celulares, proceso conocido como “cap snatching”, se poliadenilan y se exportan al citoplasma para su traducción en proteínas virales. Las polimerasas virales recién sintetizadas (PB1, PB2 y PA) y las NP virales se importan al núcleo para aumentar la tasa de síntesis de ARN viral, mientras que las proteínas de la membrana del virus HA, NA y M2 se transportan y se insertan en la membrana plasmática, a través de la vía secretoria (Figura 7) [52]. En las últimas etapas de la infección, las proteínas M1 y NS2 se unen a los vRNP y medían su exportación al citoplasma, primero, y, después, a la membrana plasmática. Todo esto da como resultado la incorporación de los vRNP en nuevas partículas de virus con una membrana derivada de la membrana plasmática del hospedero y contiendo las proteínas transmembranales virales. Finalmente, los nuevos viriones salen por gemación. La actividad de NA evita la unión no productiva de HA de nuevos viriones a receptores que portan ácido siálico presente en las glicoproteínas virales y en la membrana de las células infectadas, facilitando la diseminación viral.

Varios autores sugieren que el proceso replicativo del virus puede dar como resultado la muerte celular con implicaciones patológicas a tiempos largos de infección. Además, las partículas víricas generadas

por el proceso infectivo, inducen una respuesta pro-inflamatoria que es responsable del reclutamiento de células inmunes cuya función consiste en la eliminación del virus, mediante la secreción de citocinas e induciendo un proceso inflamatorio que en exceso induce inmunopatología y neumonía [72].

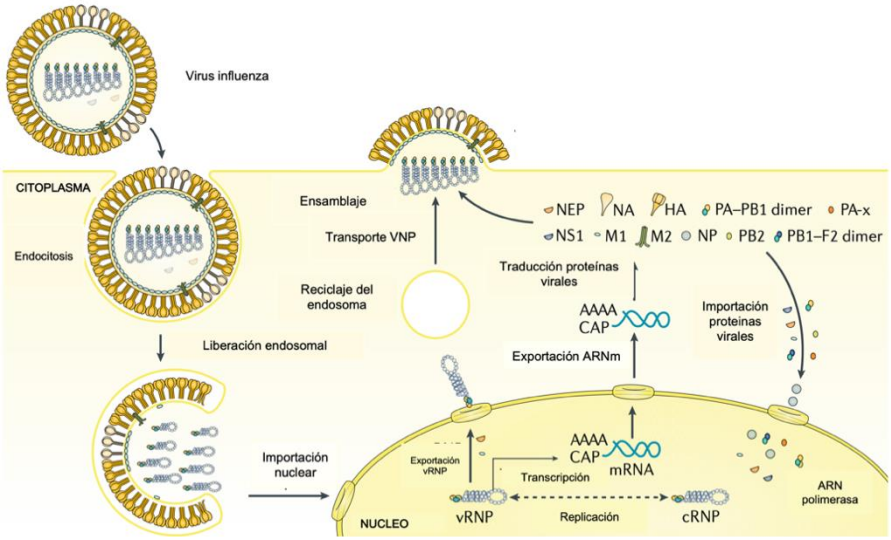


FIGURA 7. CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS DE INFLUENZA.

El virus de la influenza ingresa a la célula por reconocimiento de un residuo de ácido siálico, endocitosis y liberación endosomal por acidificación del interior de la partícula viral. Su material genético de sentido negativo en forma de ribonucleoproteínas virales (vRNP) se importa al núcleo para la transcripción del ARNm y la replicación a través de un intermedio de ribonucleoproteína complementaria de sentido positivo (cRNP). El ARNm viral se traduce en proteínas virales en el citoplasma, y estas se ensamblan en nuevos viriones junto con los vRNP recién sintetizados. PB1-F2 se muestra aquí como un dímero, pero también puede ser multimérico. HA, hemaglutinina; M1, proteína de matriz; M2, proteína de membrana; NA, neuraminidasa; NEP, proteína de exportación nuclear; NP, nucleoproteína; NS1, proteína no estructural; PB1, PB2 y PA, ARN polimerasas virales. Tomado y modificado de [52].

I.2.3 RESPUESTA INMUNE FRENTE A INFLUENZA.

Los virus son "parásitos celulares obligados" que "secuestran" la maquinaria celular para replicarse antes de ser liberados e infectar células vecinas y, eventualmente, otros organismos. Como ya se mencionó de forma previa, el primer paso en la infección viral es la unión del virus a la membrana plasmática y su entrada a la célula, a lo que sigue la replicación viral y, finalmente, su liberación de los virus recién formados. Con base a los eventos de co-evolución entre los sistemas virales y el sistema inmune, las nuevas cepas virales han desarrollado mecanismos sofisticados para interferir con la respuesta inmune del hospedero, lo que lleva a una carrera que definirá sí el patógeno se establece crónicamente o es eliminado; esta situación puede resultar en el desarrollo de respuestas inmunopatológicas [73]. La pérdida de equilibrio de la respuesta

inmune, así como la liberación exacerbada de citocinas, juega un papel clave en el daño pulmonar, la enfermedad sistémica y la muerte en la infección por el virus de influenza. Sin embargo, a pesar de estos mecanismos, algunas cepas de virus de influenza presentan un incremento en la replicación de su genoma y un aumento de la síntesis de proteínas virales. Por esta razón es importante entender tanto el proceso en el que las proteínas virales participan en el proceso replicativo y ensamble del virus, así como en los mecanismos para alterar y evadir la respuesta celular e inmunológica.

I.2.4 RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A INFLUENZA.

Las principales células blanco de los virus de la influenza son las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio y que inician una respuesta inmunitaria antiviral tras la detección del virus. La inmunidad innata del hospedero representa una barrera crucial que los virus deben superar para replicarse y propagarse en nuevos hospederos, razón por la cual los virus de la influenza dedican varias de sus proteínas virales para superar la respuesta inmunológica del hospedero. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa durante la infección, la cual se basa en el reconocimiento de estructuras conservadas exhibidas por patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos PAMP pueden ser detectados por proteínas del hospedero conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (PRR). El IAV es reconocido por al menos tres familias distintas de PRR, incluidos los receptores tipo Toll (TLR), los receptores similares al dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) (NLR) y los receptores tipo RIG-I (RLR) [73]. Estos PRR facilitan la detección viral en distintos compartimentos celulares de diferentes tipos de células y en diferentes fases de infección [73].

Los receptores tipo Toll, reconocen patrones específicos de los microorganismos, por ejemplo TLR2 y TLR4, se localizan en la superficie celular y reconocen las glicoproteínas proteínas virales HA y NA. TLR7 reconoce ARN de cadena sencilla de virus en compartimentos endosomales de células dendríticas plasmacitoides (pDC) e induce la producción de interferones (IFN) de tipo I a través de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88). Por otro lado, TLR3 reconoce y detecta, en endosomas de macrófagos, células infectadas e inicia respuestas proinflamatorias a través de la señalización de interferón-β inductor de adaptador que contiene el dominio TIR (TRIF). Finalmente, un miembro de la familia NLR que responde a la infección por IAV es NLRP3, que participa en la activación del inflamosoma, reside en el citosol de varios tipos de células, es capaz de desencadenar la inducción de IL-1β e IL-18 a partir de la activación de caspasa-1. RIG-I por su parte, es un sensor del ARN de influenza y el inductor de IFN en células infectadas por influenza [74].

Tanto los interferones de tipo I (IFN-α e IFN-β) como los interferones de tipo III (IFN-λ) [75] pueden inhibir la replicación viral en las células epiteliales (Figura 8). Algunas de las proteínas antivirales inducidas por INF son: MxA, la OAS/RNasa L y PKR.

MxA es una GTPasa citoplasmática que reconoce las RNPs del virus que han sido liberados al citoplasma y cuya función es inhibir su importación al núcleo. La OAS es activada por el dsRNA viral y convierte ATP en 2´5´ oligoadenilato, molécula que posteriormente activa a la RNasa L, cuya función es degradar al ARN de cadena simple tanto viral como celular, inhibiendo la síntesis proteica y la replicación viral [76]. Por último, la proteína PKR también reconoce el dsRNA viral y una vez activada fosforila la subunidad-α del factor eucariótico iniciador de la traducción 2a (eIF2a), provocando la inhibición de la síntesis de proteínas tanto celulares como virales; por otro lado PKR estabiliza el ARNm de INF, asegurando la traducción de esta citocina [77].

Por otro lado, la proteína receptora tipo dominio de oligomerización por unión a nucleótidos-3 (NRLP3), forma un complejo multiproteico conocido como “inflamasoma” que actúa como plataforma para activar la caspasa-1. NLRP3 recluta la proteína adaptadora ASC (proteína asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa). ASC contiene un dominio PYD N-terminal y un dominio de activación y reclutamiento de caspasa C-terminal (CARD) que es esencial para la unión y el reclutamiento de caspasa-1 al inflamasoma. La activación del inflamasoma NLRP3 y la producción de IL-1β generalmente requieren dos señales. La primera señal puede ser desencadenada por agonistas de TLR, lo que lleva a la activación transcripcional de NLRP3. La segunda señal se activa en respuesta a varias señales de estrés asociadas con moléculas dañadas propias y no propias. En el caso de la infección por el virus de la influenza de DC y macrófagos, la participación de TLR7 desencadena la primera señal, mientras que la actividad del canal iónico M2 en la red trans-Golgi sirve como la segunda señal para activar NLRP3 [74]. Una vez activada, la caspasa-1 puede activar a citocinas como IL-1β e IL-18, que se liberan al entorno extracelular participando en la activación del sistema de inflamación y activación de la inmunidad adaptativa. La IL-1β actúa sobre las células dendríticas promoviendo el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, induciendo la migración de neutrófilos, monocitos, células dendríticas y células NK al tejido pulmonar infectado. Por su parte, los macrófagos residentes en tejidos y las células dendríticas también pueden ser infectados por el virus, pero la producción viral parece estar limitada en estas células inmunes innatas. Sin embargo, la exposición de estas células a la infección viral da como resultado su activación y la secreción de citocinas proinflamatorias, lo que lleva al reclutamiento de células innatas adicionales, como las células NK y los monocitos proinflamatorios a los pulmones, donde pueden controlar Infección viral al matar las células infectadas.

Aunque estas respuestas del hospedero a la infección son cruciales para la eliminación del virus y la inducción de respuestas inmunes adaptativas, una respuesta exacerbada puede conducir a inmunopatología y enfermedad grave. Por ejemplo, niveles altos de netocis de neutrófilos pueden provocar daño pulmonar e infección grave por el virus de la influenza. Las terapias destinadas a reducir esta llamada "tormenta de citocinas" podrían ser beneficiosas para los pacientes con influenza grave.

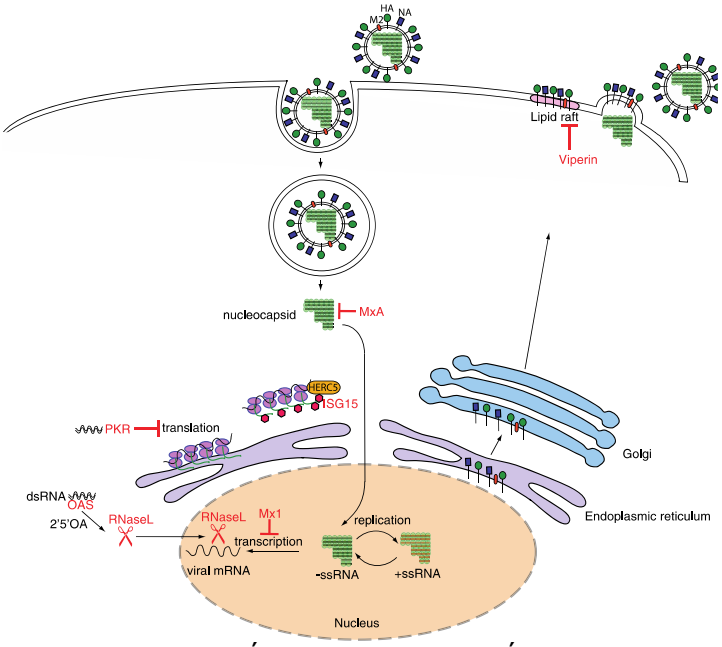


FIGURA 8. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS INTERFERONES.

Los interferones son proteínas que ejercen un efecto antiviral al intentar restringir el virus en varios pasos de la infección viral. La MxA humana en el citosol evita la importación de los vRNPs al núcleo, mientras que la proteína Mx1 bloquea la transcripción viral en el núcleo. En el citosol, el dsRNA viral activa la oligoadenilato sintetasa 2'-5 ' (OAS) y la proteína quinasa R (PKR). OAS produce oligoadenilato 2'5 ' a partir de ATP, que activa una ribonucleasa latente, RNasaL. La ARNasaL escinde el ARNm viral (así como el ARNm del huésped). La PKR activada por dsRNA inhibe la traducción, lo que altera la síntesis de proteínas virales. ISG15 modifica las proteínas recién sintetizadas (la mayoría de ellas son proteínas virales) formando un complejo con HERC5. La viperina altera la gemación viral al interrumpir las balsas de lípidos. Tomado de [74].

Por otro lado, el epitelio respiratorio participa en la separación física de una amplia gama de antígenos, contaminantes y agentes infecciosos presentes en el espacio aéreo de los pulmones del interior del hospedero. Las células epiteliales respiratorias también funcionan como un sensor de agentes infecciosos para iniciar respuestas inflamatorias junto con la muerte celular por infección [78]. Varios patógenos causan principalmente tres vías de muerte celular programada: apoptosis, necroptosis y piroptosis [74]. Durante mucho tiempo, la capacidad de inducir la muerte celular de un virus se interpretó

como la medida de su potencial patógeno, sin embargo, su propagación depende completamente del entorno intracelular de las células huésped [72, 79]. A nivel celular, la generación de muerte celular inmediata, en respuesta a la infección, bloquea la propagación del virus y, por lo tanto, protege al resto de la población celular cercana de una carga viral en aumento. Este resultado se comprueba con la codificación de proteínas virales “anti-muerte” en algunos tipos de virus, mientras que otros interactúan con proteinas asociadas a la apoptosis para ejercer su efecto. Sin embargo, si la relación entre la muerte celular y la infección por el virus se examina a nivel de organismo, la respuesta a la pregunta es más compleja, ya que los virus presentan diferentes tropismos tisulares y diversas estrategias para infectar y replicar. En general, la interacción de tres factores clave: tiempo, capacidad inmunogénica y especificidad tisular pueden determinar el resultado final de la muerte celular en la infección por virus [80].

Hay que considerar que si bien la respuesta inune innata juega un papel importante en la respuesta frente a la infección por IAV, muchas de las respuestas celulares pueden evadirse por proteínas específicas del virus. Por ejemplo, la proteína NS1 del virus es una proteína de unión a ARN que previene la activación de sensores de ARN viral citoplásmico RIG-I, durante el proceso de replicación activa del virus. Esta última proteína reconoce los ARN virales de influenza en el extremo 5'-trifosfato y la estructura de ARN bicatenario adyacente formada por los extremos 5 'y 3' de los ARN virales que se requieren para la replicación del ARN viral y transcripción. Una vez que RIG-I se activa por el reconocimiento de la estructura del ARN del virus, expone su dominio N-terminal reclutador de caspasas (CARD) para que éste sea poliubiquitinado por las ligasas de ubiquitina ”Tripartite Motif Protein Family (TRIM25)” y/o RIPLET, tras lo cual se oligomeriza y se asocia con la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), formando un complejo de señalización que activa al factor regulatorio de interferón 3 (IRF3) y NFκB, factores de transcripción necesarios para la transcripción del interferón en el núcleo celular [81]. Además, la proteína NS1 es capaz de inhibir esta cascada de señalización antiviral interactuando directamente con RIG-I e inactivándolo. NS1 también puede prevenir la síntesis y el procesamiento del ARNm del hospedero. Otras proteínas del virus de la influenza pueden inhibir la respuesta antiviral mediada por interferón. PB1-F2, una proteína viral no estructural, generada a partir de un marco de lectura abierto alternativo presente en el segmento viral de PB1. Esta proteína ejerce un papel en la mediación de la respuesta inmune del hospedador similar al de la proteína NS1 como antagonista del INF, potenciando las coinfecciones bacterianas [81] . PB1-F2 interfiere con el complejo RIG-I/MAVS, inhibiendo la activación del factor regulador del interferón IRF-3, lo que inhabilita la respuesta innata conducida por las proteínas de la familia del INF tipo I del hospedero. Esto se relaciona de manera directa con un aumento en la infiltración por neutrófilos y macrófagos en las vías

aéreas, aumentando la mortalidad y patogenia de las neumonías bacterianas secundarias a infecciones por el virus de influenza A. Por último, esta proteína ha demostrado tener un papel regulador de la apoptosis de la célula hospedero, permeabilizando la membrana mitocondrial y provocando la liberación de citocromo C [77] hacia el citosol, e iniciando la cascada proapoptótica mediada por las caspasas. PB2, es una proteína que forma parte de la polimerasa viral. PA-x, una proteína viral que resulta del desplazamiento del marco de lectura del ARNm de la ARN polimerasa viral PA, degradando ARNm del hospedero generados por la ARN polimerasa II, en virtud de su actividad ARN endonucleasa [82, 83].

Todos estos mecanismos de evasión del virus permiten conocer las estrategias por las que IAV logra su replicación de manera eficiente, así como la respuesta celular e innata pudiera contender con la infección.

I.2.5 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA FRENTE A INFLUENZA.

Las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas resultan clave en la protección del hospedero ante la infección por el virus de la influenza. Tras el reconocimiento de los antígenos virales y la interacción con las células T $CD4^+$ afines, las células B "naive" se activan. En general, la respuesta de anticuerpos derivados de la inmunidad adaptativa a la infección por el virus de la influenza es relativamente amplia y de larga duración.

Por su parte, la respuesta inmune mediada por anticuerpos se induce de manera rápida y conlleva la formación de anticuerpos neutralizantes que reducen la replicación y diseminación del virus tanto a nivel local en la mucosa del tracto respiratorio superior y del tejido pulmonar en el tejido linfoide asociado a los bronquios, como a nivel sistémico en los ganglios linfáticos que drenan la infección, desde donde migran hacia los centros germinales de los nódulos linfáticos.

La interacción de los linfocitos B con los linfocitos T $CD4^+$ activados y con células dendríticas, en los nódulos linfáticos, promueve la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria. Éstos serán altamente específicos frente a esa cepa viral y protegerán al individuo en el caso de reinfección por una cepa homóloga, sin embargo, debido a la alta tasa de mutaciones que sufre el virus de la influenza, esta inmunidad mediada por anticuerpos deja de ser específica en caso de infección por una cepa mutada, aunque sí se mantiene protección parcial gracias a la reactividad e inmunidad cruzada de los anticuerpos neutralizantes frente a regiones conservadas de la HA. Durante la última pandemia en el año 2009 por la cepa A(H1N1)pmd09 la morbi-mortalidad en los ancianos fue inesperadamente baja, y estudios serológicos realizados en personas

nacidas antes de la década de 1970 mostraron que estos individuos estaban parcialmente protegidos por reactividad cruzada de los anticuerpos frente a una cepa H1N1 previamente circulante [52].

En la infección por el virus de la influenza, se requiere la ayuda de las células T $CD4^+$ para el cambio de clase de isotipo y para la activación de las células T $CD8^+$. Es muy bien conocido, como las células T $CD8^+$ se activan y van a desempeñar un papel efector en la respuesta citotóxica para la erradicación del virus de la influenza. Los componentes antigénicos destacados son el NP, la proteína de matriz M1 y las polimerasas virales. De particular interés es el hecho de que las células infectadas exhiben péptidos virales de 8-12 aminoácidos de longitud que se unen a glucoproteínas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; codificado por los genes HLA), estos péptidos forman un complejo antigénico al unirse a los receptores TCR localizados en la membranas de las células CTL. Estos péptidos generalmente se derivan de componentes dentro del virus que están menos sujetos a la deriva antigénica seleccionada por anticuerpos y, por lo tanto, están más conservados en distintas cepas y subtipos del virus de la influenza. Este reconocimiento facilita la eliminación de las células infectadas y evitando su propagación hacia otros tipos celulares.

I.3 TGF-β_1 E INFLUENZA.

Como ya se mencionó previamente, mediante 4 estrategias importantes los virus pueden modificar la señalización del TGF-β_1, así como de otros factores de crecimiento, favoreciendo su ciclo replicativo y perpetuidad (ver Figura 4).

Una de las causas del desarrollo de la gravedad en la enfermedad causada por influenza es la hipercitocinemia en pacientes infectados por el virus de la influenza A y que puede estar asociada con la mortalidad por la infección. A ese respecto, se ha sugerido que uno de los principales mecanismos patogénicos atribuidos a la infección por IAV es su capacidad para desencadenar lo que se ha denominado una "tormenta de citocinas" [84]. En este contexto, se encontraron niveles bajos de IFN-β y TGF-β_1 en mujeres embarazadas con infección severa por influenza A (H1N1) pdm09 [85]. Por otro lado, otro estudio mostró que los niveles séricos de TGF-β_1 son diferentes entre controles sanos, pacientes con influenza A (H1N1) pdm09 y pacientes con otras causas de neumonía adquirida. En ese sentido, los niveles de TGF-β_1 se correlacionaron negativamente con la etapa clínica SOFA (“Sequential Organ Failure Assessment”) al ingreso en pacientes con influenza A (H1N1), sugiriendo que los niveles de TGF-β_1 son una herramienta útil para diferenciar la influenza A (H1N1) pdm09 de otras causas de neumonía que progresa a sepsis. Estos

niveles bajos y anormales de TGF-β_1 también se observaron cuando se analizaron muestras tomadas 96 horas después de la admisión, indicando que existe una correlación negativa entre los niveles de TGF-β_1 y el puntaje clínico SOFA al ingreso en pacientes con influenza A (H1N1) pdm09 [86].

De forma previa, *Schultz-Cherry, et al.,* evidenciaron que la concentración de TGF-β_1 activo en suero de ratones a las 24 horas post-infección se incrementaba como consecuencia de su activación por la neuraminidasa viral (NA). Además relacionaron el aumento de los niveles de TGF-β_1 activo con la inducción apoptosis en la línea celular MDCK a través de ensayos de fragmentación de ADN en geles de agarosa, sugiriendo su papel potencial en la patogénesis [87]. Trabajos posteriores de este grupo mostraron que la administración exógena de TGF-β_1 a través de un vector de adenovirus de replicación deficiente proporciona protección contra la patogénesis de la influenza H5N1 y, por el contrario, la neutralización de TGF-β_1 durante la infección resultó en incremento en la infección viral. En este mismo trabajo, observaron que varios subtipos del virus de la influenza A (H1N1, H1N2, H3N2, H5N9, H6N1 y H7N3) indujeron la activación de TGF-β_1, excepto las cepas altamente patógenas H5N1 tanto *in vitro* como en *in vivo*. Por su parte, la adición exógena de TGF-β_1 a ratones infectados con el virus de la influenza H5N1 retrasó la mortalidad y redujo los títulos virales, mientras que la neutralización de TGF-β_1 durante la infección por H5N1 y la pandemia de H1N1 2009 aumentó la morbilidad. Estos datos en conjunto muestran que TGF-β_1 parece desempeñar un papel muy activo en la protección del hospedero de la patogénesis de la influenza [88].

Por otro lado, el asma es un factor de riesgo en pacientes que se infectan con influenza, donde el TGF-β_1 puede jugar un papel en el desarrollo de lesión, remodelación y desarrollo de fibrosis pulmonar. *Furuya, et al,* empleando un modelo murino de asma, observó que los ratones asmáticos presentaron resistencia al desarrollo de la tormenta de citocinas y, por lo tanto, a la consecuente citotoxicidad en las vías respiratorias ante la infección viral. Por su parte, los lisados pulmonares de estos ratones mostraron concentraciones de TGF-β_1 significativamente elevados, sin embargo no mostraron cambios significativos en los titulos virales a diferentes tiempos post-infección, pero sí entre ratones infectados control y ratones asmáticos e infectados [89].

Hay que considerar que la activación de los receptores para PAMPs son importantes para montar una respuesta inmune innata antiviral, generando la activación de los factores IRF3 e URF7 que a su vez favorecerán la síntesis de Interferones. Sin la activación de la señalización antiviral innata, IRF3 reside principalmente en el citosol y no está asociado con Smad3. Tras la activación del RLR por el ARN del virus, IRF3 se fosforila formando un dímero que se transloca al núcleo para activar la transcripción de los

promotores que contienen IRE (Elementos de Respuesta Interferones). Algunos IRF3 activados atenúan la señalización de TGF-β_1 mediante mecanismo basado en la similitud estructural de su dominio de transactivación con el dominio Smad3 MH2, evitando así su asociación con TβRI y atenuando la activación de Smad3 inducida por TGF-β_1. En el núcleo, el IRF3 activado compite con los correguladores de Smad3/4, interrumpiendo así la formación de complejos funcionales de Smad y su unión a los promotores que responden a Smad y las respuestas asociadas a esta citocina [64, 90].

Finalmente, en el plano fisiológico, el TGF-β_1 parece desempeñar un papel muy importante en la homeostasis de las mucosas, previniendo respuestas inflamatorias perjudiciales. Al parecer TGF-β_1 sirve como un mecanismo de acoplamiento de las células a su entorno, de forma tal que las células tienen plasticidad para responder apropiadamente a los cambios en el medio ambiente. Sin embargo, en el contexto de la infección por el virus de influenza, TGF-β_1 podría participar no solo en los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria, sino que podría alterar varios de los niveles de control de la homeostasis pulmonar, de manera tal, que esta pérdida de control podría favorecer una respuesta inflamatoria severa, con consecuencias respiratorias en el paciente. En su conjunto, esta información sugiere que TGF-β_1 podría jugar un papel importante en la inmunopatología asociada a la infección por el virus de influenza, ya que los virus pueden, de manera indirecta, modificar la señalización asociada a TGF-β_1, cambiando la respuesta celular e inmunológica del hospedero.

II. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente la infección por influenza representa un serio problema de salud, tanto a nivel nacional como mundial. Una de las prioridades de la Organización Mundial de la Salud, es el desarrollo de un tratamiento eficiente en contra de diversos virus respiratorios, entre ellos para la infección por el virus de influenza (IAV). Asimismo, resulta crítico el reconocimiento de que un alto porcentaje de los procesos clínicos y patológicos ocasionados por esta infección viral ocurre como consecuencia de la respuesta inflamatoria exagerada no controlada. Por lo cual, es importante la caracterización de los eventos intracelulares inducidos durante la infección viral, la replicación viral y la inducción de procesos inflamatorios, así como conocer el patrón de síntesis de las proteínas en respuesta a diferentes estímulos. Por ello, el estudio integral de la respuesta inmune podría permitir el diseño de estrategias terapéuticas para combatir la infección y la inmunopatología asociada a la infección por este virus.

En este contexto, se ha identificado la presencia de diversas citocinas que pueden participar en la respuesta frente a la infección por IAV, siendo TGF-β_1 una citocina multifuncional con importantes funciones de regulación inmunitaria y con implicación directa durante la infección viral.

Durante la infección por IAV, las células epiteliales son las primeras en generar una respuesta de defensa, siendo TGF-β_1 una de las citocinas cuya expresión y síntesis se incrementa en el epitelio de las vías respiratorias después de la infección por IAV. Sumado a esto, parece que IAV ha evolucionado para alterar las acciones inmunoreguladoras del TGF-β_1

Toda vez que se desconoce con exactitud la participación del TGF-β_1 en la resistencia antiviral y la tolerancia frente a la infección por IAV, los resultados obtenidos durante el presente proyecto aportarán información valiosa en los mecanismos moleculares asociados a la inmunopatología inducida durante la infección viral en modelos *in vitro* y que se encuentra asociada a la participación de TGF-β_1 en la infección viral. Por ello, el presente trabajo, tiene como finalidad la disección molecular de los componentes asociados a la señalización por TGF-β_1, dentro del contexto inmunológico y de los eventos de muerte celular, inducción de citocinas inflamatorias como IL-1β y de señalización, que permitan revelar proteínas que se encuentren asociadas a la inmunopatología asociada a la infección por IAV. Esta información contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para un control eficiente de la morbilidad por influenza.

III. HIPOTESIS

La activación por TGF-β_1 de la vía de Smad, inhibe la respuesta celular asociada a la infección *in vitro* por el virus de Influenza A H1N1 en células A549.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar los eventos celulares asociados a la estimulación con TGF-β_1 generados por la infección *in vitro* con IAV H1N1(New Caledonia/99).

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Implementar el sistema infección *in vitro* en células A549 por el virus de influenza A H1N1(New Caledonia/99).
2. Evaluar la apoptosis inducida por la infección viral y la estimulación con TGF-β_1.
3. Evaluar el efecto de TGF-β_1 sobre la replicación del IAV H1N1(New Caledonia/99).
4. Evaluar el efecto TGF-β_1 en la secreción de IL-1β.
5. Evaluar la activación y regulación de la vía canónica para TGF-β_1 en la infección de células A549 con y sin estimulación con TGF-β_1.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 CULTIVOS CELULARES.

Se utilizó la línea celular MDCK (ATCC CCL-34) como modelo de células adherentes para la titulación viral y la línea A549 (ATCC CCL-185) como modelo de infección en epitelio bronquial. Estas líneas se cultivaron en medio Modified Eagle´s (MEM) y Dubelcco´s Modified Eagle´s F-12 (DMEM F-12), respectivamente, suplementados con 10% de SFB (Biomeda) y antibiótico al 1%. Para la crio-preservación de las líneas celulares se añadió 5% de DMSO (MP Biomedicals) al SFB y se mantuvieron en congelación bajo N_2 líquido. El número y la viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión de azul trípano. Los pases de continuidad de las líneas se llevaron a cabo utilizando la solución TrypLE Express (GIBCO 12604) añadiendo la solución directamente a la caja de cultivo y manteniéndola durante 10 minutos a 37 ºC y 5% de CO_2. Al término de este tiempo, se añadió medio de cultivo suplementado con SFB y las células se centrifugaron a 1200 rpm, se lavaron con PBS estéril y se contabilizaron para los ensayos correspondientes o se diluyeron para su crecimiento y uso posterior.

V.2 PREPARACIÓN DE STOCK VIRAL Y TITULACIÓN EN CÉLULAS MDCK.

Los ensayos de infección se llevaron a cabo utilizando el virus IAV H1N1 (New Caledonia/99), donado por el Dr. Pavel Isa del laboratorio del Dr. Carlos Arias del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La titulación viral se determinó mediante el ensayo de formación de placas en monocapa confluente de células MDCK en cajas de 6 pozos. De manera resumida, se agregaron diluciones seriadas del lote de virus, en medio MEM sin SFB, y se incubaron por una hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2. Posteriormente se agregó medio MEM (1X) con agarosa al 0.65%, antibiótico al 1% y tripsina TPCK (2 µg/ml) (Sigma-Aldrich Co.). Las placas se incubaron en posición invertida durante 48 horas a 37°C y 5% de CO_2. Finalmente, las placas se fijaron con formaldehido al 10% por dos horas y se visualizaron por tinción con cristal violeta al 10%. El título viral se determinó por la cuenta de placas líticas y se expresó como unidades formadoras de placas (pfu/ml).

V.3 PURIFICACIÓN DE VIRUS.

El sobrenadante de células MDCK infectadas se colocó cuidadosamente sobre un colchón de 3 ml de sacarosa al 30% en buffer NTE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=7.4, 1 mM EDTA), y se centrifugó

durante dos horas y media a 4°C a 25,000 rpm. Posterior a ello, se desechó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 700 µl de buffer NTE [91].

El virus concentrado se purificó en un gradiente de sacarosa de 30-60% y centrifugó a 32,000 rpm durante 3 horas a 4 °C. Finalmente la banda opalescente correspondiente al virus, localizada entre el 30 y 40% de sacarosa, se recolectó cuidadosamente y se añadió buffer NTE para centrifugar a 40,000 rpm durante 2 horas a 4°C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer NTE y se cuantificó por ensayo en placa.

V.4 TINCIÓN PARA ANÁLISIS POR MICROSCOPIA.

Para verificar la capacidad infectiva del virus purificado en células A549, se realizó un análisis por microscopia para la proteína NS1 del virus. Para ello, se sembraron celulas A549 sobre cbreobjetos colocados en cajas de 12 pozos. Al llegar a confluencia, las células se trataron con las condiciones anteriormente mencionadas, y se recolectaron 24 horas post-infección. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X estéril, se fijaron con metanol/acetona (1:1) y se mantuvieron a -20°C toda la noche. Al día siguiente, la mezcla metanol/acetona se eliminó y las muestras se secaron a temperatura ambiente por 2 horas. Al término de este tiempo, se añadió PBS para rehidratar las células, manteniendo las muestras en una cámara húmeda. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% en una cámara húmeda durante 5 minutos, se lavaron y se bloquearon con suero humano al 7%, BSA al 2% y EDTA 2mM en PBS, durante 45 min. Se lavaron y se incubaron con el primer anticuerpo NS1 viral vC-20 (goat IgG NS-23-1 clone, Santa Cruz Biotech.), a una concentración de 200 ng/mL durante 45 min. Al término de este tiempo, se realizó un lavado con PBS estéril y se incubó con el anticuerpo goat-FITC (Jackson Immuno research) a una concentración de 2.5 µg/mL durante 45 min. Posteriomente, las células se lavaron y se incubaron con 300 nM DAPI por 5 minutos. Finalmente las muestran se fijaron con glicerol al 10% en PBS, sobre un vidrio portaobjetos y se sellaron perfectamente. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Apotome Zeiss Axiovert 200 M) a las longitudes de onda correspondientes para la identificación con DAPI (461 nm) y FITC (520 nm). Las imágenes se obtuvieron utilizando Axiocam MRM y el software Axiovision 3.1 (Carl Zeiss, Inc.).

V.5 INFECCIÓN VIRAL Y ESTIMULACIÓN CON TGF-β_1.

Se sembraron células A549 a confluencia en placas de 6 pozos y se incubaron en medio DMEM/F12 sin SFB durante 2 horas. Al término de este tiempo, las células recibieron diferentes condiciones de tratamiento.

Se estudiaron diferentes condiciones de tratamiento de infección y de estimulación con TGF-β_1, las cuales fueron: células control, células estimuladas con TGF-β_1, células infectadas con IAV, células estimuladas con TGF-β_1 como tratamiento de pre-incubación e infectadas y células infectadas con IAV y, posteriormente, tratadas con TGF-β_1.

Los tratamientos mencionados se realizaron después del tiempo de incubación con medio DMEM/F12 y se describen a continuación:

Células control (sin tratamiento): las cuales se mantuvieron en medio DEM/F12 sin SFB durante una hora, células con TGF-β_1: la estimulación con TGF-β_1 se realizó al incubar las células con 5 ng/ ml de esta citocina durante 1 hora a 37ºC. Al término de este tiempo, las células se lavaron con solución de PBS y se añadió medio DMEM/F12 fresco, antibiótico y sin SFB.

Células infectadas con IAV: las células se infectaron a una multiplicidad de infección de 10 MOI durante 1 hora a 37ºC y después de este tiempo, las células se lavaron con solución salina PBS y finalmente se añadió el medio de cultivo DMEM/F12 sin SFB, antibiótico y 2ng/ml de tripsina TPCK.

Células pre-estimuladas con TGF-β_1: las células se estimularon con TGF-β_1 (5 ng/ml) por una hora, se lavaron con solución salina PBS, se adicionó medio DMEM/F12 y se infectaron a una multiplicidad de 10 durante 1 hora más a 37ºC. Al término de este tiempo las células se lavaron con solución PBS y se adicionó medio de cultivo DMEM/F12 sin SFB, antibiótico y 2ng/ml de tripsina TPCK.

Células infectadas y estimulas con TGF-β_1: las células se infectaron a una multiplicidad de 10 y se incubaron durante 1 hora, al término de este tiempo, se lavaron con solución salina PBS, se adicionó medio DMEM/F12 y se estimularon con TGF-β_1 (5 ng/ml) por una hora adicional a 37ºC. Al término de este tiempo las células se lavaron con solución PBS y se adicionó medio de cultivo DMEM/F12 sin SFB, antibiótico y 2ng/ml de tripsina TPCK.

Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para su evaluación por ensayos de ELISA a las 24 horas post-infección y se almacenaron a -20ºC hasta su análisis. A diferentes tiempos post-infección las células se lavaron con solución PBS y se lisaron para su análisis por inmunodetección.

V.6 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.

Para el análisis de inmunodetección por western blot y el microarreglo de proteínas apoptóticas, la fracción proteina se obtuvo a 4ºC, utilizando el buffer de lisis RIPA (25 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% IgePal, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, pH 8.0, complementado con los inhibidores de proteasas Mini-complete e inhibidores de fosfatasas Phospho-stop (Roche)). Los sobrenadantes se centrifugaron a 13,000 rpm y se almacenaron a -20ºC hasta su uso.

Se cuantificó la concentración de proteína mediante ensayos de Bradford (Bio Rad). Se utilizó la concentración de 25 μg de proteína por cada tratamiento para el estudio de inmunodetección de proteinas de señalización mediante Western blot.

Brevemente, el análisis por SDS-PAGE se realizó utilizando el método de Laemmli [92, 93], en geles de poliacrilamida a diferentes porcentajes y empleando una cámara Miniprotean 3 Cell (Bio Rad). El volumen correspondiente a 25 μg de proteína fue desnaturalizado en "sample buffer" 2X (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glicerol al 4%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.5% w/v y 0.05% β-mercaptoetanol), se calentaron por 5 min a 95 ºC en un baño seco (Barnstead/Termolyne). Las muestras se corrieron en los geles de poliacrilamida por una hora a 40 mA y 200 V utilizando la fuente de poder EPS 301 (Amershan Pharmacia Biotech). Seguido a esto, las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a membrana de nitrocelulosa de 0.2μm (BIO-RAD), en las condiciones recomendadas por el proveedor. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se incubó por dos horas con el buffer de bloqueo (TBS: Tris, 0.07% Tween20, 5% w/v leche descremada) ó con una solución de BSA (BSA al 1% en TBS/Tween 0.05%). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS/Tween20 (0.05%) y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 ºC, con los diferentes anticuerpos primarios en solución de TBS/ Tween20 (0.05%). Se utilizaron los anticuerpos de SMAD-7 (goat IgG clona N-19, Santa Cruz Biotech.), SMAD 2/3 (goat IgG clona N-19, Santa Cruz Biotech.), phospho-SMAD 2/3 (rabbit IgG Ser 423/425, Santa Cruz Biotech.), anti-M1viral (mouse HB-64, ATCC), proteína NS1 viral vC-20 (goat IgG NS-23-1 clone, Santa Cruz Biotech.), caspasa-1 (rabbit IgG 178280, Abcam), TβRI (rabbit IgG clona RM0016-3A11, Santa Cruz Biotech.), TβRII (mouse IgG clona C-4, Santa Cruz Biotech.) y β-actina (goat IgG clona C-4, Santa Cruz Biotech.).

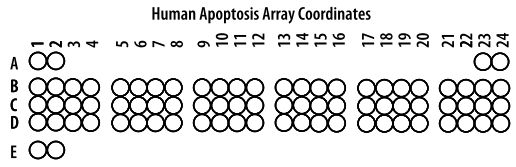
Después de la incubación del anticuerpo primario, las membranas se lavaron con la solución TBS/Tween20 (0.05%) tres veces durante cinco minutos cada uno y a continuación se incubaron por 1 hr con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), (Jackson ImmunoResearch). Finalmente, las membranas se incubaron por 1 min con el reactivo Western lightning chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y la imagen de quimioluminiscencia fue obtenida en una

cámara ChemiDoc XRS (BIORAD). Los análisis densitométricos se realizaron con el software Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad), empleando la misma área en mm^2 para la comparación de pixeles.

V.7 MICROARREGLO DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A APOPTOSIS.

Los lisados de proteína de los diferentes tratamientos se utilizaron para evaluar la abundancia relativa de 35 proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis, utilizando el kit Human Apoptosis array kit (R&D Systems, Cat. Num. ARY009). Cada panel de apoptosis de este kit, se incubó con 25 μg de proteína de los tratamientos anteriormente mencionados, siguiendo las instrucciones del proveedor. Finalmente, las membranas se incubaron por 1 min con el reactivo Western lightning chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y la imagen de quimioluminiscencia fue obtenida en una cámara ChemiDoc XRS (Bio Rad). Los análisis densitométricos se realizaron con el software Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad), empleando la misma área en mm^2 para la comparación de pixeles correspondiente a cada par de puntos de señales. En la Figura 9, se muestra la información sobre del panel de apoptosis indicando la localización de los puntos control y las coordenadas de cada cada proteína de estudio en el panel de apoptosis (Figura 9a), así como la correspondencia a la proteína apoptotica a identificar por inmunodetección (Figura 9b). El análisis comparativo individual y el mapa (heat map) entre proteínas relacionas con la apoptosis se realizó utilizando el software Prism v.8.0 (GraphPad).

a)



b)

Coordinate	Target/Control	Coodinate	Target/Control
A1, A2	Reference Spots	C13, C14	HO-2/HMOX2
A23, A24	Reference Spots	C15, C16	HSP27
B1, B2	Bad	C17, C18	HSP60
B3, B4	Bax	C19, C20	HSP70
B5, B6	Bcl-2	C21, C22	HTRA2/Omi
B7, B8	Bcl-x	C23, C24	Livin
B9, B10	Pro-Caspase-3	D1, D2	PON2
B11, B12	Cleaved Caspase-3	D3, D4	p21/CIP1/CDKN1A
B13, B14	Catalase	D5, D6	p27/Kip1
B15, B16	cIAP-1	D7, D8	Phospho-p53 (S15)
B17, B18	cIAP-2	D9, D10	Phospho-p53 (S46)
B19, B20	Claspin	D11, D12	Phospho-p53 (S392)
B21, B22	Clusterin	D13, D14	Phospho-Rad17 (S635)
B23, B24	Cytochrome c	D15, D16	SMAC/Diablo
C1, C2	TRAIL R1/DR4	D17, D18	Survivin
C3, C4	TRAIL R2/DR5	D19, D20	TNF RI/TNFRSF1A
C5, C6	FADD	D21, D22	XIAP
C7, C8	Fas/TNFRSF6/CD95	D23, D24	PBS (Negative Control)
C9, C10	HIF-1α	E1, E2	Reference Spots
C11, C12	HO-1/HMOX1/HSP32		

FIGURA 9. PANEL DE APOPTOSIS R&D SYSTEMS.
a) Información sobre la localización de los puntos control y las coordenadas correspondientes a cada proteínas de estudio en el panel de apoptosis. b) Proteínas apoptoticas localizadas en el panel de apoptosis para identificar por inmunodetección. (Tomado del proveedor de R&D Systems, cat. ARY009).

V.8 ANÁLISIS DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para la determinación de la muerte celular inducida por la infección por el virus y el efecto del tratamiento de TGF-β_1 sobre la infección por el virus de influenza, se analizaron mediante citometria de flujo los diferentes tratamientos anteriormente mencionados utilizando la tinción con YOPRO-1 [94]. Para el análisis de células con virus inactivado (iIAV), el virus purificado fue tratado con psoralen a una concentración de 40 μg/ml y una longitud de onda de 260 nm durante 15 min; este virus inactivado se incubó con células A549 tal cuál se especifica para células infectadas en la sección V.5.

Se cosecharon las células A549 a las 24 horas post-infección mediante el siguiente protocolo: las células adherentes se lavaron 3 veces con PBS y se despegaron cuidadosamente utilizando la solución de Versene frío (PBS 1X, EDTA 2 mM), se centrifugaron y se lavaron nuevamente con PBS. Posteriormente, se incubaron con 50nM YOPRO-1 (Molecular probes, Invitrogen) a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 30 minutos y se dispuso a comenzar el análisis por citometria. Al momento de la lectura en el citometro se añadió una concentración final de 30 ng/ml de Ioduro de Propidio (IP) (Molecular probes, Invitrogen) y las muestras se analizaron en un citómetro FACS Calibur BD (longitud de emisión de 488nm), con el software CellQuest v.3 (Becton Dickinson). Para compensar las fluorescencias de cada fluoróforo, se analizaron por separado a células que se incubaron únicamente para Yo-Pro e IP. Se consideraron células en apoptosis aquéllas que fueron doble positivas ($Yo\text{-}Pro^+/IP^+$) [94]. Con el fin de confirmar los resultados, se realizaron tres ensayos independientes, donde en cada caso se evaluaron al menos 10,000 eventos por ensayo.

V.9 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ELISA.

Los sobrenadantes de las células tratadas bajo las diferentes condiciones ya mencionadas, se fijaron en placas de 96 pozos de alta unión utilizando una solución de bicarbonato de sodio 1 mM durante toda la noche a una dilución 1:1 a 4°C. Al día siguiente, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se bloqueraon con leche descremada al 5% por 2 horas. Después, se incubaron con los anticuerpos correspondientes a TGF-β_1 (Preprotech), IL-1β (Preprotech) y TNF-α (Preprotech) por 2 horas. Se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario de inmunoglobulina conjugada con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch). Para finalizar, las placas se analizaron a 405 nm con solución ABTS (Sigma).

V.10 CUANTIFICACIÓN DE FOCOS INFECTIVOS.

Se sembraron cajas de 96 pozos con células A549 y se les dio tratamientos de infección y con TGF-β_1 (Preprotech) antes y después de la infección. Al término de los tratamientos, se recolectaron los sobrendantes a las 24 y 48 hs post-infección y se almacenaron a -70ºC hasta su uso. Por otro lado, se sembraron células MDCK y se trataron con los sobrenadantes obtenidos de células A549 por duplicado en placas de 96 pozos. Después de 1 h de incubación, se eliminó el inóculo y las células se lavaron dos veces con PBS y se suplementaron con medio de crecimiento sin FBS. A las 16 post-infección, las células se fijaron con acetona al 80% en PBS y se añadió un anticuerpo anti-M1viral (mouse HB-64, ATCC) y se incubaron durante una hora a 37 ºC. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante una hora a 37 ºC con un anticuerpo IgG anti-conejo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch). Los complejos inmunes se detectaron mediante tinción con 3-amina-9-etil carbazol (Sigma Aldrich) en tampón acetato 1 M. Se contaron las células teñidas (foco) y se informaron los títulos virales como unidades formadoras de foco por ml (ffu/ml).

V.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó estadística descriptiva, con media y desviación estándar. Todas las pruebas experimentales se llevaron a cabo en ensayos independientes duplicados o triplicados. Las diferencias significativas se determinaron usando la prueba t de Student y considerando un valor de $p<0.05$ y $p<0.001$. Se utilizó el software Prism v8.0 (GraphPad Inc.).

VI. RESULTADOS.

VI.1 OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL STOCK VIRAL.

Para la obtención del stock viral de la cepa de IAV H1N1, el virus se expandió mediante la infección de células MDCK en medio MEM libre de suero y se recolectó a las 40 horas post-infección. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 1200 rpm para la eliminación de debris celulares. Se determinó el título viral mediante ensayos de formación de placas líticas en células MDCK en confluencia. El titulo viral se obtuvo contando el número de placas, considerando cada placa lítica como una unidad formadora de placa (pfu). En este sentido, el lote de medio MEM con virus tuvo un título de $5x10^6$ pfu/ml.

Debido a que la capacidad infectiva del stock viral obtenido en células MDCK no era alta, requerimos generar otro stock viral con mayor capacidad infectiva, para lo cual purificamos el virus utilizando un gradiente de sacarosa. Este procedimiento consistió inicialmente en concentrar el virus mediante un colchón de sacarosa. A continuación, el pellet obtenido se resuspendió, se colocó sobre un gradiente de sacarosa (30-60%) y se centrifugó a 32,000 rpm [91]. Finalmente, las bandas opalescentes obtenidas se rescataron para su cuantificación y análisis posteriores. En la Figura 10 se muestran las bandas opalescentes recuperadas y analizadas, durante el procedimiento de purificación.

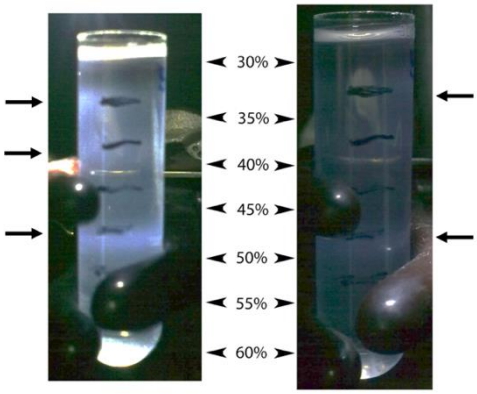


FIGURA 10. PURIFICACIÓN VIRUS INFLUENZA A H1N1.

Mediante un gradiente de sacarosa, se purificó y concentró el virus de influenza A H1N1 expandido en células MDCK en medio de cultivo libre de SFB. El gradiente se obtuvo mediante centrifugación a 32,000 rpm durante 3 horas. Al término de este proceso, se observaron las bandas opalescentes al iluminar con luz blanca en la parte superior del tubo en un cuarto oscuro. Se extrajeron las bandas obtenidas mediante punción del tubo y se lavaron para su posterior análisis de infección. Las flechas muestran las bandas opalescentes en el gradiente.

El título del stock viral se determinó mediante ensayos de placa lítica en células MDCK, las bandas opalescentes que se obtuvieron en el gradiente de sacarosa correspondientes a los porcentajes de sacarosa entre el 30 y 40%. En la Figura 11, se puede observar el ensayo de placa lítica del virus recuperado, el cual mostró un claro perfil de formación de placas, mostrando un título de 9.7 x 10^8 pfu/ml, lo cual corresponde a un incremento en 100 veces de la preparación inicial del virus obtenido en células MDCK.

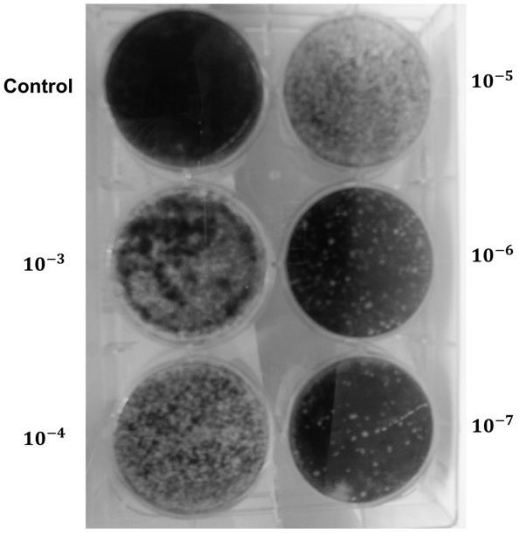
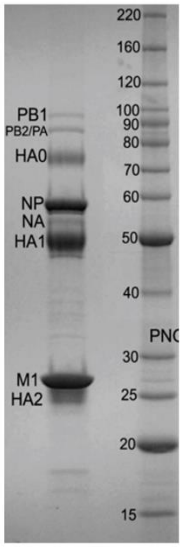
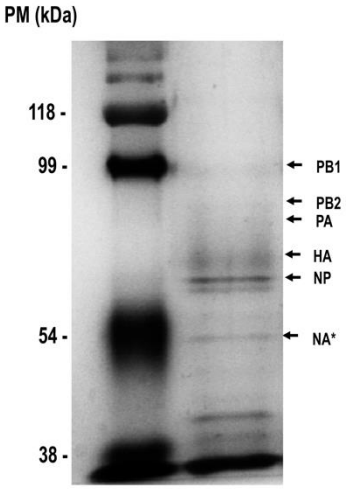


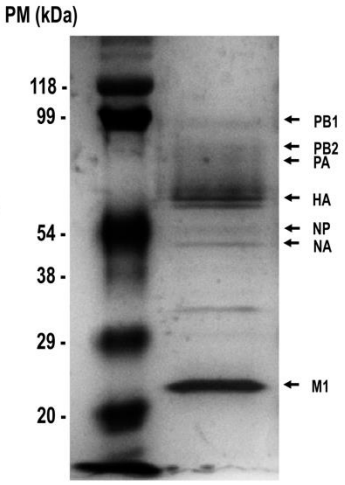
FIGURA 11. ENSAYO DE PLACAS LÍTICAS EN CÉLULAS MDCK.
Cuantificación de IAV mediante la formación de placas líticas en la línea celular MDCK.

Adicionalmente al ensayo de placa lítica, se verificó la presencia de las proteínas virales mediante geles desnaturalizantes de acrilamida. Para ello se realizaron geles al 10 y 12% en los cuales se visualizaron las diferentes bandas correspondientes a proteínas virales (Figura 12). Hay que recordar que 9 proteínas virales se encuentran en la partícula vírica, siendo que NS1, PB1-F2 y PA-x se sintetizan durante la infección viral. En la Figura 12a podemos observar los pesos moleculares en kDa de las proteínas encontradas en la partícula vírica. Como podemos notar, en los incisos b y c) de la Figura 12, se obtuvieron bandas correspondientes a los pesos de las proteínas virales (pesos indicados en el inciso d). Por lo que, en resumen, la purificación del virus de influenza mediante un gradiente de sacarosa incrementó el título viral.

a) b) c) d)







Proteína viral	PM (KDa)
PB1	86.5
PB2	85.7
PA	82.5
HA	63.5
NP	56.2
NA	49.6
M1	27.8
M2	11.3
NS2 (NEP)	14.3

FIGURA 12. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES DE VIRUS PURIFICADO POR GRADIENTE DE SACAROSA POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE.

Se muestran las imágenes de geles de acrilamida a diferentes porcentajes. a) Imagen tomada de [91]. para el análisis y comparación de bandas correspondientes a proteínas virales. b) Gel al 10% de acrilamida. c) Gel al 12% de acrilamida. d) Tabla que muestra los pesos correspondientes a las proteínas del virus presente en la partícula vírica.

Finalmente, se verificó la capacidad infectiva del virus purificado en células A549 por western blot y microscopia de fluorescencia. Se empleó el anticuerpo monoclonal específico para la proteína NS1 de virus de Influenza para confirmar la infección de las células A549 por inmunodetección mediante western blot. En la Figura 13a se observa la inmunodetección de NS1 correspondiente a una sola banda de 27 kDa. Para verificar la capacidad infectiva del virus purificado, se realizó un ensayo de microscopia de fluorescencia para detectar la presencia de la proteína NS1 (Figura 13b). Las células fueron infectadas a MOI 10 y se recuperaron para su análisis a las 24 hrs post-infección. Asimismo, para contrastar los núcleos celulares se empleó DAPI. De esta manera, se observó que la presencia de NS1 en el 60-70% de células analizadas por campo. Es notable comentar, que gran parte de las células mostraron una importante fluorescencia para NS1 en el núcleo celular, mayor incluso que la presente en el citoplasma.

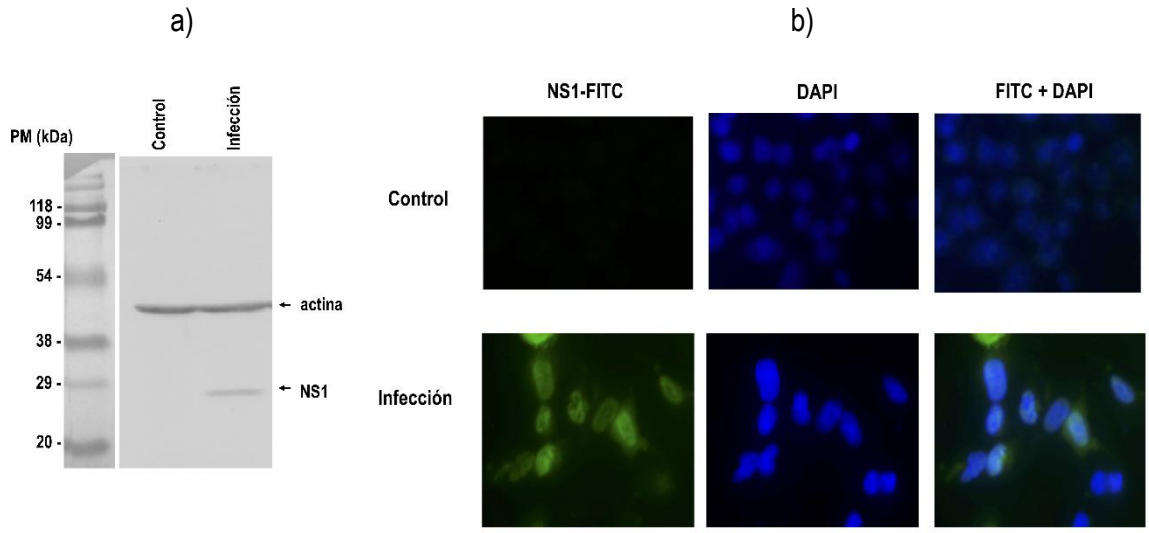


FIGURA 13. INMUNODETECCIÓN DE NS1 POR INFECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA EN LA LÍNEA CELULAR A549 MEDIANTE WESTERN BLOT Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

a) Imagen de identificación por western blot de NS1 (27 kDa) en células infectadas y de actina (42 kDa) en células control e infectadas, b) Imagen representativa microscopia de fluorescencia para la inmunodetección de NS1 en células A549. Para analizar por microscopia los núcleos fueron teñidos con DAPI y la proteína NS1 utilizando un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo FITC.

VI.2 EFECTO DE TGF-β_1 SOBRE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR IAV.

TGF-β_1 es una citocina con efectos pleiotrópicos sobre diferentes tipos celulares, siendo uno de estos, el efecto pro-apoptótico que ha sido ampliamente caracterizado, sin embargo, los mecanismos parecen variar según el modelo celular en estudio. Muchos estudios proponen que la apoptosis inducida por la infección del virus influenza participa de manera importante en el daño que ocurre durante la infección con el virus influenza, siendo este mecanismo favorable también para su propagación hacia otras células.

Por ello, se evaluó el impacto de la pre-incubación de TGF-β_1 y su efecto sobre la muerte celular ocasionada por el virus influenza. Para esto, se determinó el efecto apoptótico de TGF-β_1, analizando el porcentaje de células positivas para Yo-Pro/ioduro de propidio (Yo-Pro$^+$/IP$^+$). en células infectadas por IAV, células tratadas con TGF-β_1, y la pre-incubación de TGF-β_1 previo a la infección por IAV, mediante ensayos de citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura 14, la citocina TGF-β_1 por si misma, indujo la muerte celular de la línea A549 como ya se ha reportado para esta citocina [1]; así también, la infección con IAV ocasionó un incremento en la muerte celular dosis dependiente a diferentes MOI de

infección. Por otro lado, la pre-incubación con TGF-β_1 mostró una reducción en el porcentaje de células Yo-Pro$^+$/IP$^+$. Como se puede notar, la pre-estimulación con TGF-β_1 tanto a 2 como a 5 ng/ml, redujo de manera significativa, cerca de 3 veces la inducción de apoptosis en células A549 con respecto a aquéllas que solo fueron infectadas con IAV. En la Figura 14, se observan los resultados totales de 3 repeticiones independientes de este ensayo, mostrando que hubo una diferencia significativa entre la presencia o ausencia del pre-tratamiento con TGF-β_1, sobre el efecto apoptótico del virus influenza.

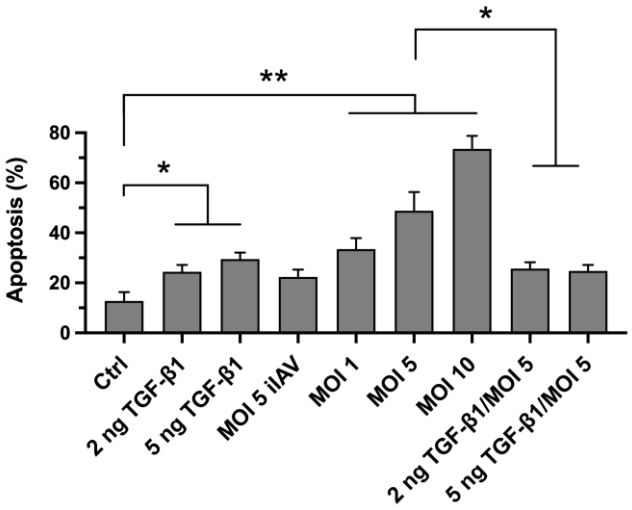


FIGURA 14. EFECTO DE TGF-β_1 EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INFLUENZA H1N1 MEDIANTE ANÁLISIS EN CITOMETRIA DE FLUJO EN LA LÍNEA CELULAR A549.

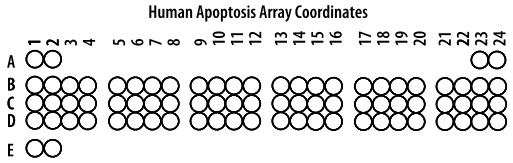
Las células A549 se infectaron a diferentes MOIs de virus de influenza A H1N1 y se incubaron durante 24 horas. Para analizar el efecto de TGF-β_1 sobre la infección por el virus, las células A549 se trataron con TGF-β_1 durante una hora previo a la infección con el virus. Análisis estadístico de células A549 que fueron dobles positivas (YO-PRO/ Ioduro de propidio). iIAV, virus influenza A inactivado con psoralen. El análisis se llevó a cabo mediante la prueba T-student con un valor de $p<0.05$ *, $p<0.01$**, n=3.

Esta información, resulta relevante ya que la reducción de células YoPro$^+$/IP$^+$ debido a la pre-estimulación con TGF-β_1 con respecto a células infectadas, podría sugerir que activación de la cascada de señalización del TGF-β_1 inhibe con la muerte celular inducida por el virus. Por esta razón, con el objetivo de identificar las vías apoptóticas que pudieran estar relacionadas con la infección por IAV y TGF-β_1, se utilizó un microarreglo de proteínas relacionadas con la apoptosis (kit Human Apoptosis array kit, R&D Systems). Para esto, se utilizaron 25 µg de extracto de proteína de células bajo las siguientes condiciones: control, con tratamiento con TGF-β_1, con infección por IAV y con pre-tratamiento con TGF-β_1 e infectadas. En la Fígura 15 se observan los resultados del experimento utilizando el panel de apoptosis (R&D Systems). Como ya se ha

mencionado, TGF-β_1 induce la activación de vías de señalización relacionadas con la apoptosis, por lo que como se esperaba, esta citocina por si misma indujo un aumento en la densidad relativa de algunas proteínas asociadas a la apoptosis con respecto a las células control. Por otro lado, la infección por el virus influenza incrementó la presencia relativa de proteínas pro-apotóticas incluso en mayor grado que el tratamiento solo con TGF-β_1. De manera interesante, el pre-tratamiento con TGF-β_1 no sólo anuló el incremento de proteínas pro-apoptóticas sino que la densidad relativa de los "spots" fue menor que la presente en las condiciones control.

Con el fin de hacer más evidente el efecto del pre-tratamiento con TGF-β_1 sobre el efecto inducido por el virus influenza, se realizó un análisis de las densidades relativas de los "spots" para cada proteína y se comparó mediante el formato de heatmap (Figura 16). La Figura hace evidente que la infección por el virus influenza indujo una mayor presencia, tanto en número (25 de 35 proteínas) como abundancia relativa, de proteínas pro-apoptóticas que las inducidas por el tratamiento con TGF-β_1 (Figura 16). Sin embargo, el pre-tratamiento de TGF-β_1 bloqueó de manera importante el efecto del virus influenza.

a)



b)

Coordinate	Target/Control	Coodinate	Target/Control
A1, A2	Reference Spots	C13, C14	HO-2/HMOX2
A23, A24	Reference Spots	C15, C16	HSP27
B1, B2	Bad	C17, C18	HSP60
B3, B4	Bax	C19, C20	HSP70
B5, B6	Bcl-2	C21, C22	HTRA2/Omi
B7, B8	Bcl-x	C23, C24	Livin
B9, B10	Pro-Caspase-3	D1, D2	PON2
B11, B12	Cleaved Caspase-3	D3, D4	p21/CIP1/CDKN1A
B13, B14	Catalase	D5, D6	p27/Kip1
B15, B16	cIAP-1	D7, D8	Phospho-p53 (S15)
B17, B18	cIAP-2	D9, D10	Phospho-p53 (S46)
B19, B20	Claspin	D11, D12	Phospho-p53 (S392)
B21, B22	Clusterin	D13, D14	Phospho-Rad17 (S635)
B23, B24	Cytochrome c	D15, D16	SMAC/Diablo
C1, C2	TRAIL R1/DR4	D17, D18	Survivin
C3, C4	TRAIL R2/DR5	D19, D20	TNF RI/TNFRSF1A
C5, C6	FADD	D21, D22	XIAP
C7, C8	Fas/TNFRSF6/CD95	D23, D24	PBS (Negative Control)
C9, C10	HIF-1α	E1, E2	Reference Spots
C11, C12	HO-1/HMOX1/HSP32		

c)

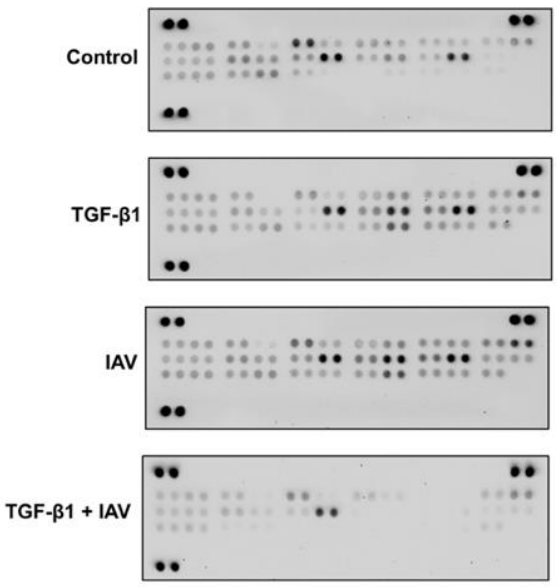


FIGURA 15. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 REDUCE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS EN CÉLULAS INFECTADAS POR IAV EN LA LÍNEA CELULAR A549.

a) Información sobre la localización de los puntos control y las coordenadas correspondientes a cada proteínas de estudio en el panel de apoptosis. b) Proteínas apoptoticas localizadas en el panel de apoptosis para identificar por inmunodetección. (Imágenes tomadas del instructivo del proveedor de R&D Systems, cat. ARY009). c) Los lisados de proteínas de células con diferentes tratamientos,

fueron analizados utilizando el panel de apoptosis de R&D Systems. El ensayo de inmunodetección del panel de apoptosis mostró cambios notables en la activación de proteinas relacionadas con la apoptosis entre los diferentes tratamientos.

De una manera mas clara, se realizo un analisis gráfico de las densidades relativas obtenidas con el microarreglo de apoptosis (Figura 17), donde se observa la modulacion de proteinas como proteinas HSP, clusterin, claspin, la forma activa para caspasa-3, p53, asi como diversas proteinas con capacidad de activar la via intrinseca y extrinseca de apoptosis. Esta reduccion en proteinas pro-apoptoticas debido a la pre-estimulación con TGF-β_1, muestra como la infeccion viral parece inducir la muerte celular, mientras que esta citocina parece prevenir este proceso si se incuba de manera previa. Es importante recalcar que la prevención de células en apoptosis con el tratamiento con TGF-β_1, sugiere un rol importante de esta citocina en la muerte celular inducida en la infección por IAV, ya que reduce la presencia relativa de una amplia gama de marcadores clásicos de proteínas pro-apoptóticas como caspasa-3 activa, XIAP, Bcl-X; así como proteinas HSP.

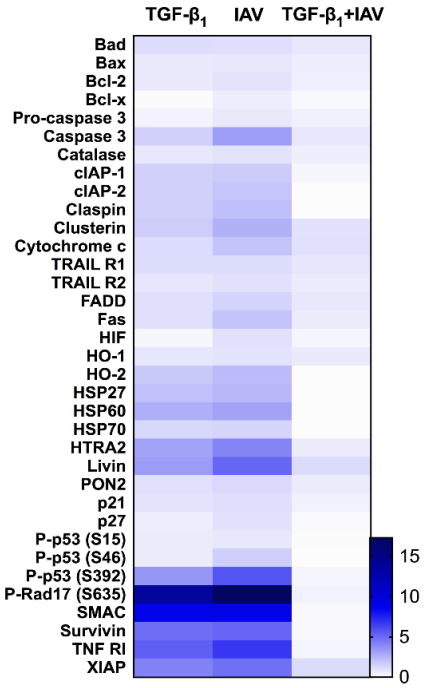


FIGURA 16. TGF-β_1 REDUCE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE PROTEÍNAS APOPTOTICAS EN UN ANÁLISIS DE HEAT MAP.

Se determinó la relación entre la densidad relativa en pixeles/mm^2 de cada pareja de puntos correspondientes a una proteina apoptotica de un tratamiento sobre el tratamiento control.

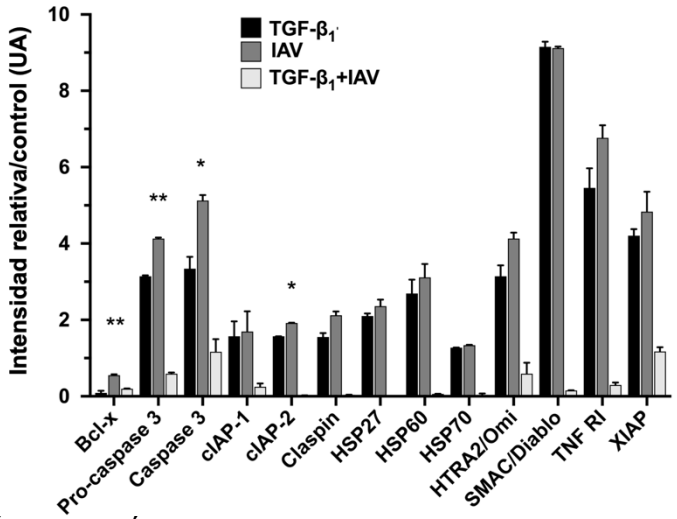


FIGURA 17. ANÁLISIS GRÁFICO DE ABUNDANCIA RELATIVA DE PROTEÍNAS APOPTOTICAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

Se determinó la relación entre la densidad relativa en pixeles/mm^2 de cada pareja de puntos correspondientes a una proteina apoptotica de un tratamiento sobre el tratamiento control. Los asteriscos indican identifican a las proteinas que aumentaron su densidad relativa promedio de forma significativa debido a la infección por IAV, en comparación con el tratamiento previo con TGF- β_1.

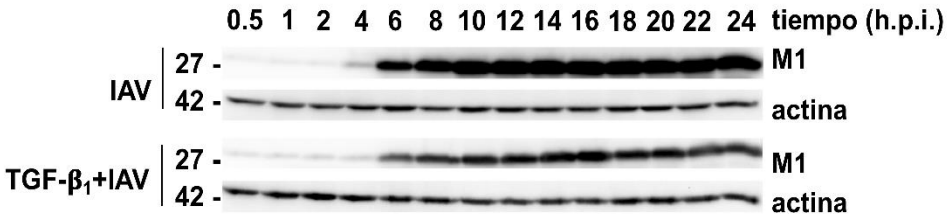
VI.3 EFECTO DE TGF-β_1 SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL.

Con el fin de evaluar si el pre-tratamiento con TGF- β_1 afecta la replicación del virus de IAV, se evaluó mediante ensayos de inmunodetección por western blot la abundancia relativa de M1, en una cinética de 24 horas post-infección (Figura 18).

En la Figura 18a, se observa que el pre-tratamiento con TGF-β_1 reduce la presencia de M1 durante la cinética de estudio a 24 hpi, siendo que a partir de 6 hpi se manifiesta una reducción en la inmunodetección de M1 en el pre-tratamiento con TGF-β_1 con respecto a la infección misma. Así mismo, en el análisis normalizado de abundancia relativa de M1/actina, muestra una reducción de cerca del 30% de la proteína M1.

Por otro lado, se realizaron ensayos con sobrenadantes de células A549 infectadas y estimuladas con TGF-β_1 para, a su vez, evaluar la infectacción de células MDCK mediante la técnica de unidades formadoras de focos (uff) y de esta forma confirmar si el tratamiento con TGF-β_1 participa en la regulación de la replicación del virus (Figura 19).

a)



b)

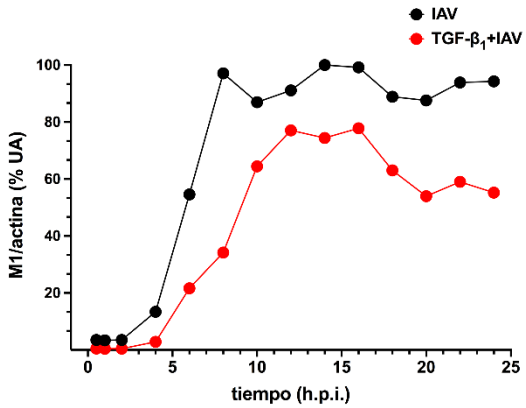


FIGURA 18. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE EL TIEMPO DE APARICIÓN Y LA ABUNDANCIA RELATIVA DE M1 EN CÉLULAS A549.

a) Análisis de inmunodetección por western blot de M1 (27 kDa) durante 24 horas post-infección (h.p.i.). b) Análisis comparativo de abundancia relativa de M1 y β-actina en células A549, n=2.

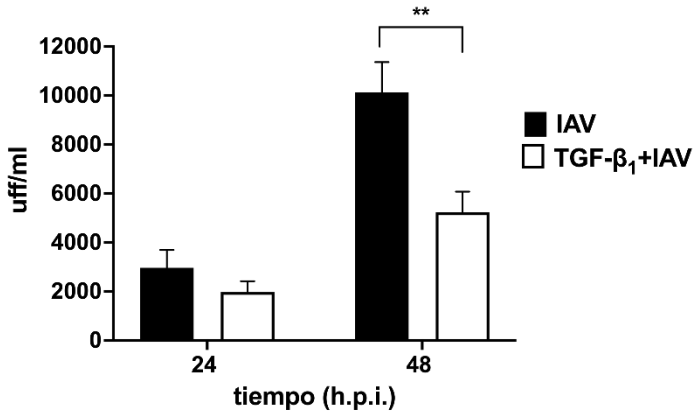


FIGURA 19. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β_1 A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LOS TÍTULOS VIRALES CUANTIFICADOS COMO UNIDADES FORMADORAS DE FOCOS (UFF) EN CÉLULAS A549 A 24 Y 48 HPI.

Cuantificación de uff por tinción intracelular utilizando anticuerpos anti-M1 en células MDCK infectadas con sobrendantes de células A549 estimuladas a 24 y 48 hs post-infección. El análisis se llevó a cabo mediante la prueba T-student con un valor de $p<0.001$**, n=3.

La Figura 19 confirma que el pre-tratamiento con TGF-β_1 a la infección con IAV, si reduce la producción de partículas víricias infectivas, influyendo en la replicación del virus en las células A549. Esta información, sugiere que el pre-tratamiento con TGF-β_1 modifica la respuesta de la célula hospedera para contender con la infección por IAV, no solo reduciendo la cantidad de células en apoptosis, sino también, potencialmente, mediante la modificación de señales intracelulares que reducen la replicación del virus *in vitro*.

VI.4 EFECTO DE TGF-β_1 EN LA SECRECIÓN DE IL-1β DEBIDO A LA INFECCIÓN POR IAV.

Ha sido ampliamente reportado que el proceso inflamatorio causado por la infección por IAV, es una respuesta celular dirigida a eliminar tanto al patógeno, así como también para eliminar los estímulos capaces de generar daño e iniciar los mecanismos de reparación. Por esta razón, y dado que se observaron cambios importantes en el patrón de abundancia de proteínas apoptóticas y una reducción en la generación de partículas víricas a 48 h.p.i., se evaluó si el pre-tratamiento con TGF-β_1 en las células A549, influye en la síntesis y secreción de IL-1β.

De esta manera, primero se evaluó si la caspasa-1 se activa bajo nuestras condiciones de estudio. En la Figura 20 se muestra los diferentes tratamientos que se utilizaron con las células A549 para estimular la activación de caspasa-1. Para ello, se utilizaron los siguientes estímulos: TNF-α (10 ng/ml), IFN-β (10 ng/ml), PMA (10 µM) y LPS (1 nM) durante 24 horas. Como se demuestra en la Figura 20, de los controles utilizados, el estímulo de TNF-α y LPS lograron inducir la activación de caspasa-1 (20 kDa) a partir de la pro-caspasa (42 kDa), mientras que las células control y tratadas con TGF-β_1 (10 ng/ml) a diferentes tiempos no se observó la activación de caspasa-1.

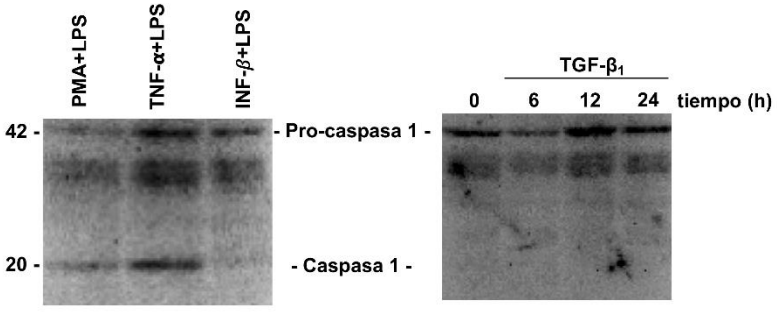


FIGURA 20. INDUCCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-1 EN CÉLULAS A549.
Análisis de inmunodetección por western blot de la forma activa de caspasa-1 (20 kDa) en una cinética de 24 horas post-infección (hpi).

Con base a los resultados de la Figura 20, se realizaron ensayos de inmunodetección por western blot para identificar el fragmento activo caspasa-1 bajo condiciones de infección y de pre-tratamiento con TGF-β_1 e infección por IAV (Figura 21).

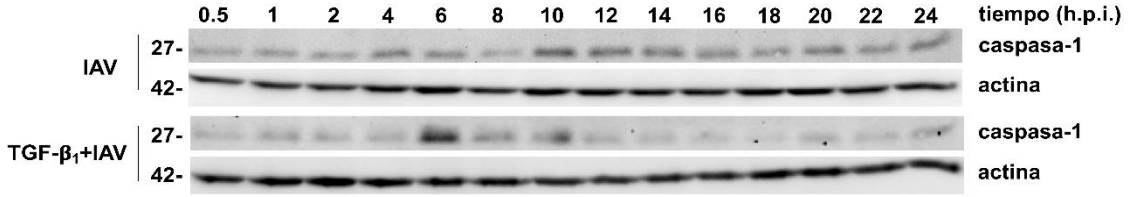


FIGURA 21. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LA ABUNDANCIA DE LA FORMA DE CASPASA-1 ACTIVA A LO LARGO DE UNA CINÉTICA DE 24 HORAS EN CÉLULAS A549.

Análisis de inmunodetección por western blot de la forma activa de caspasa-1 (27 kDa) en una cinética de 24 horas post-infección (h.p.i.).

En la Figura 21 se puede notar que la infección con IAV induce mayor activación de la caspasa-1 a tiempos largos (>12 hrs) en comparación del pre-tratamiento con TGF-β_1. Al representar los resultados normalizados y comparativos de las densidad de las bandas (Figura 22), se puede observar que la presencia de la forma activada de la caspasa-1 es similar en ambas condiciones a tiempos cortos, pero a tiempos largos, hay mayor presencia relativa de la forma activada de la caspasa. La excepción a esta regla fueron los tiempos de 6 y 8 hrs, donde la banda de la forma activa de la caspasa fue más densa en el pre-tratamiento con TGF-β_1, situación para la cual no tenemos explicación.

De manera general, la abundancia relativa de la forma activa de la caspasa-1 es mayor después de 10 hpi en células infectadas (Figura 22). Sin embargo, el pre-tratamiento con TGF-β_1 modifica el perfil de activación de caspasa-1 cuando se añade como un estímulo previo a la infección logrando modificar la aparición de proteínas virales como M1 (Figuras 18 y 19), así como la inducción de muerte celular (Figura 14).

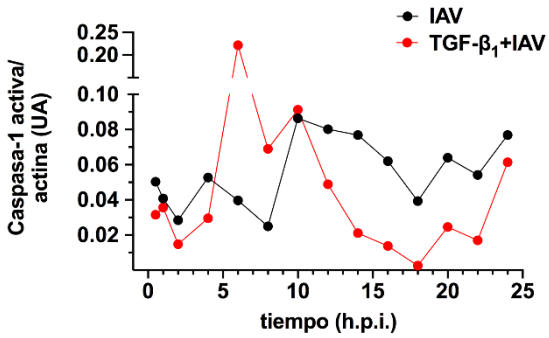


FIGURA 22. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LA FORMA DE CASPASA-1 EN CÉLULAS A549.

Análisis gráfico de densitometría de la forma activa de caspasa-1/actina en una cinética de 24 horas post-infección (h.p.i.). Los niveles de intensidad de caspasa-1 activa fueron homologados en base a la intensidad de actina (Caspasa-1 activa/actina), n=1.

La activación de caspasa-1, es una respuesta celular importante en la infección por IAV ya que participa en la activación de la citocina inflamatoria IL-1β. Por ello, se analizó el impacto de este efecto sobre los niveles de IL-1β en el sobrenadante de células pre tratadas con TGF-β_1 e infectadas (Figura 23).

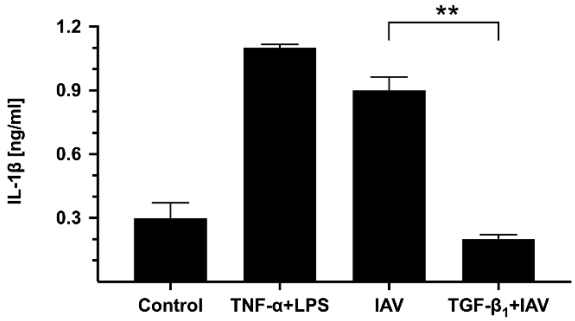


FIGURA 23. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, REDUCE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1β.

Se determinó mediante ensayo de ELISA, la concentración de IL-1β en sobrenadantes de cultivo de células A549 a 24 horas post-infección. El análisis se llevó a cabo mediante la prueba T-student con un valor de $P<0.05$ **, n=3.

Los ensayos de ELISA evidenciaron que la activación reducida de caspasa-1 causada por TGF-β_1 utilizado como un estímulo anterior a la infección con IAV, comparado con la infección por si sola, reduce la concentración de IL-1β en los sobrenadantes de células A549 (Figura 23). Este resultado propone que TGF-β_1 participa modificando el perfil apoptótico, de replicación del virus y la respuesta de la célula hospedera disminuyendo la secreción de IL-1β.

VI.5 EFECTO DE TGF-β_1 EN LA SEÑALIZACIÓN DEBIDO A LA INFECCIÓN POR IAV.

La expresión de TGF-β_1 en epitelio pulmonar aumenta después de la infección con influenza en el modelo murino, controlando la respuesta apoptótica [87, 88, 95]. Con base a esto, fue importante evaluar si esta citocina, bajo nuestras condiciones de estudio, era secretada en los sobrenadantes de cultivo células.

La forma activa de TGF-β_1 se secreta en menor concentración en células infectadas con IAV con respecto a células que fueron pre tratadas con TGF-β_1, lo que puede explicar que su presencia en sobrenadante ejerza un efecto anti-apoptotico y anti-inflamatorio *in vitro* (Figura 24).

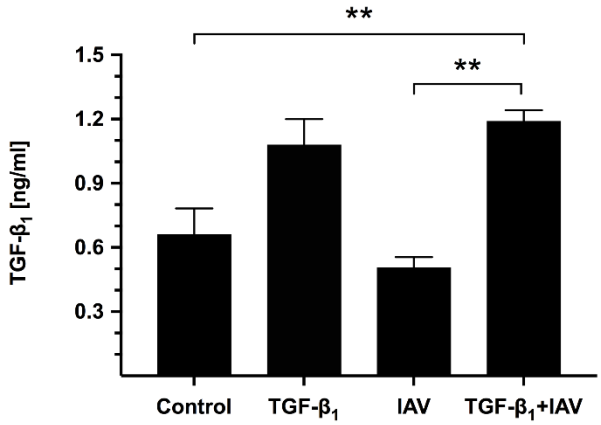


FIGURA 24. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 PREVIO A LA INFECCIÓN POR IAV, MODIFICA EL PERFIL DE SECRECIÓN DE TGF-β_1.

Se determinó mediante ensayo de elisa, la concentración de TGF-β_1 en sobrendantes de cultivo de células a549 a 24 horas post-infección. el análisis se llevó a cabo mediante la prueba t-student con un valor de $p<0.05$ **, n=3.

Si bien, la secreción de TGF-β_1 por si solo podría explicar los eventos mencionados anteriormente, una parte fundamental es analizar si la célula contiene los elementos necesarios para responder al estímulo por esta citocina. Por esta razón mediante ensayos de western blot, se estudió la inmunodetección de los receptores para TGF-β_1 (Figura 25a). Estos resultados nos muestran que en lisados celulares de células tanto infectadas como pre-tratadas con TGF-β_1 e infectadas con IAV, existe un aumento en la cantidad de receptores para TGF-β_1 (TβRI y TβRII), con respecto a las células control o solo estimuladas con TGF-β_1 (Figura 25b), proponiendo que TGF-β_1 puede unirse y activar una respuesta celular a través de su vía canónica de señalización.

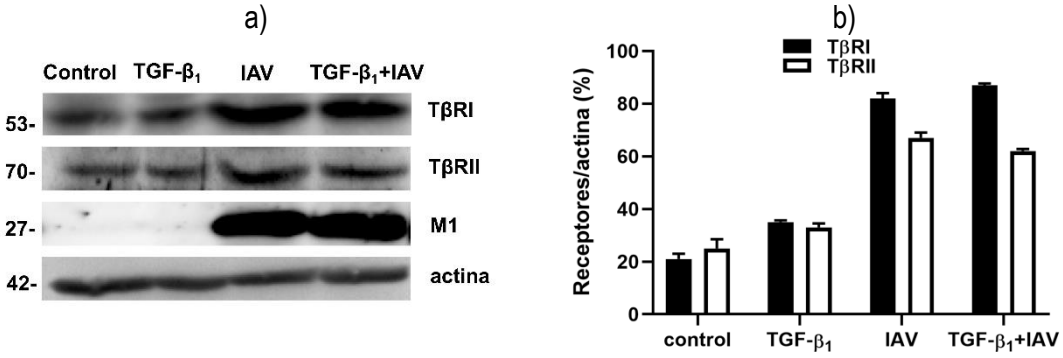


FIGURA 25. EL NIVEL DE LOS RECEPTORES PARA TGF-β_1 (TβRI Y TβRII) SE INCREMENTA BAJO CONDICIONES DE INFECCIÓN.

Se determinó mediante ensayo de western blot la presencia de los receptores para TGF-β_1 en lisados de células A549 a 24 horas post-infección. a) Imagen representativa de inmunodetección de los receptores para TGF-β_1 (TβRI y TβRII). b) Gráfico de abundancia relativa mediante análisis de densitometría para los receptores para TGF-β_1, n=2.

Con el objetivo de evaluar la activación de la vía de señalización canónica para TGF-β_1, se verificó la activación por fosforilación de las proteínas Smad-2/3 así como la aparición de Smad-7 como proteína inhibitoria de la vía, debido a estimulación con TGF-β_1 mediante ensayos de western blot en la línea celular de estudio, a períodos cortos de tiempo (Figura 26). Los resultados de estos ensayos sugieren que TGF-β_1 activa la vía de señalización dependiente de Smad en el modelo de células A549. Es por esta razón, que se hizo una análisis preliminar de la vía canónica de TGF-β_1 en la infección por IAV a 24 hpi (Figura 27).

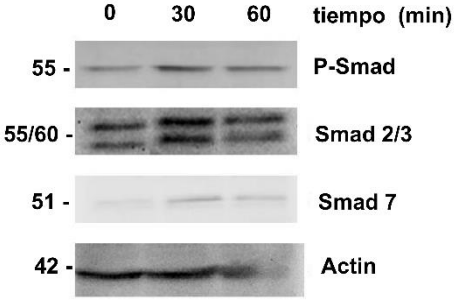


FIGURA 26. TGF-β_1 ACTIVA SU VÍA CANÓNICA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN POR FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3.

Se detectó mediante ensayo de western blot la presencia de Smad 2/3 y su forma fosforilada, así como la presencia de Smad7, una proteina inhibitoria de la vía, en lisados de células A549 a 0, 30 y 60 minutos post-estimulación con 10 ng/ml de TGF-β_1.

En la Figura 27 se observa que las infección de células A549 por IAV induce un incremento parcial de Smad7, sin un claro incremento de las formas fosforiladas de Smad2/3. Por el contrario, el pre-estimulo con TGF-β_1 induce una mayor activación de P-Smad. Esto parece sugerir que la infección mantiene durante el tiempo de estudio la presencia de Smad-7 inhibiendo la vía canónica para TGF-β_1, potencialmente explicando el efecto anti-viral, anti-apoptótico y anti-inflamatorio como consecuencia de la activación de la vía canónica para esta citocina previo a la incubación del virus.

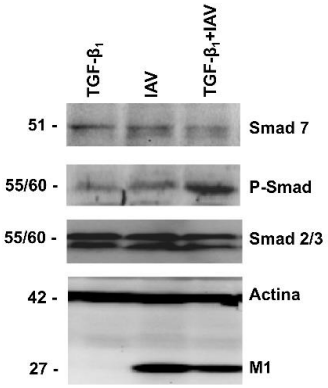


FIGURA 27. LA PRE-ESTIMULACIÓN CON TGF-β_1 INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3.

Se detectó mediante ensayo de western blot a Smad 2/3 y su forma fosforilada, así como la presencia de Smad7, una proteina inhibitoria de la vía, en lisados de células A549 bajo las diferentes condiciones de tratamientos a 24 hpi.

Con la idea de confirmar estos resultados, se realizó una cinética a 24 horas para estudiar el perfil de activación para estas proteínas de señalización para TGF-β_1 (Figuras 28 y 29).

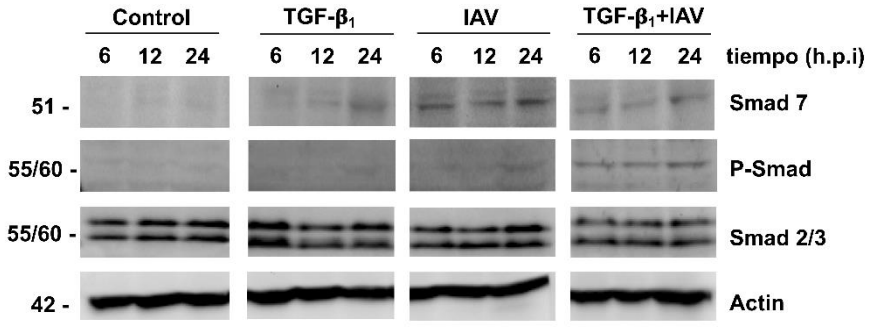


FIGURA 28. LA PRE-ESTIMULACIÓN CON TGF-β_1 INCREMENTA LA FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3.

Se detectó mediante ensayo de western blot a Smad 2/3 y su forma fosforilada, así como la presencia de Smad-7, una proteina inhibitoria de la vía, en lisados de células A549 bajo las diferentes condiciones de tratamientos a 6, 12 y 24 hpi.

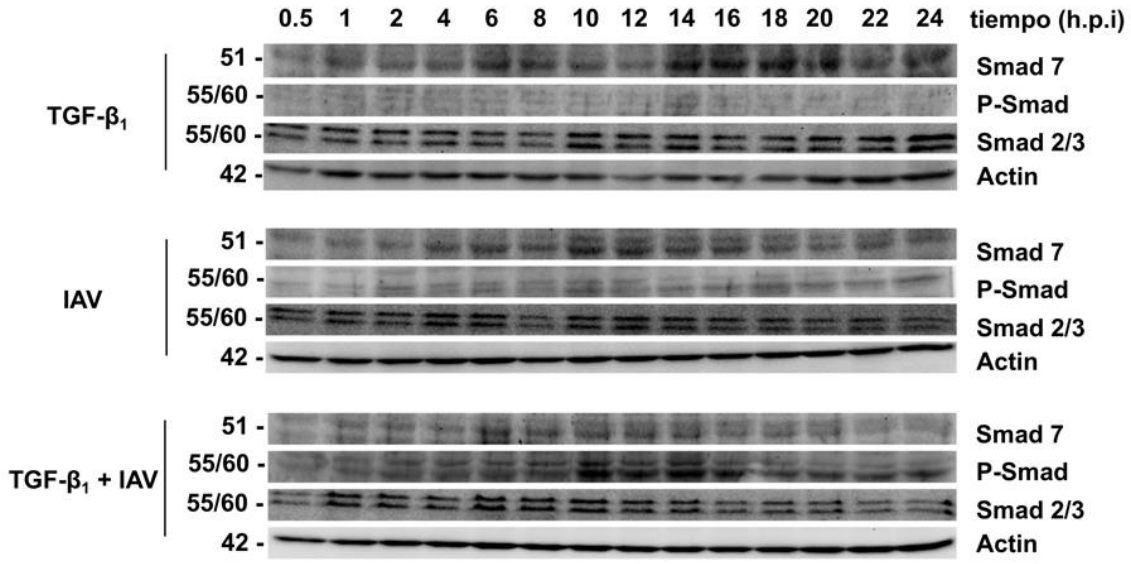


FIGURA 29. LA INFECCIÓN CON IAV INCREMENTA LA ABUNDANCIA DE SMAD-7.
Se detectó mediante ensayo de western blot a Smad-2/3 y su forma fosforilada, así como la presencia de Smad7, una proteina inhibitoria de la vía, en lisados de células A549 bajo las diferentes condiciones de tratamientos desde 0.5 hasta 24 hpi.

En la Figura 28 y 29, se observa que la fosforilación de Smad-2/3 parece ser mayor bajo las condiciones de pre-incubación con TGF-β_1, con respecto a la infección con IAV, lo cual sugiere la activación de la vía canónica de la citocina. Este efecto se vuelve más notorio al representar la abundancia relativa de la forma fosforilada para Smad-2/3 en las diferentes condiciones de tratamiento (Figura 30). Esta Figura muestra que el pre-tratamiento con TGF-β_1, durante toda la cinética de 0.5 hasta 24 hs, fue un estímulo para la activación de la fosforilación de Smad-2/3, en comparación a la infección viral.

Por su parte, como se observa en las Figuras 28 y 29, la presencia de Smad-7 parece incrementarse durante la infección viral. Al representar los cambios relativos de Smad-7 en el curso de 24 de infección se observa que Smad-7 aumenta su presencia desde las 4 y hasta las 18 hpi durante la infección viral (Figura 31). Mientras que, bajo las condiciones de pre-tratamiento con TGF-β_1, la abundancia relativa de esta proteína, es menor durante este período de tiempo. Estos resultados nos sugieren que la infección por IAV, controla la señalización de la vía canónica para TGF-β_1.

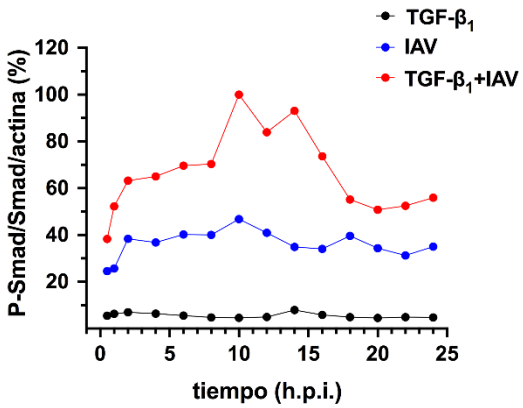


FIGURA 30. EL PRE-TRATAMIENTO CON TGF-β1 E INFECCIÓN CON IAV INCREMENTA LA ACTIVACIÓN DE SMAD-2/3.

Gráfico de abundancia relativa mediante análisis de densitometría de P-Smad-2/3 muestran diferencias desde 0.5 hasta 24 hpi entre las 3 condiciones de estudio.

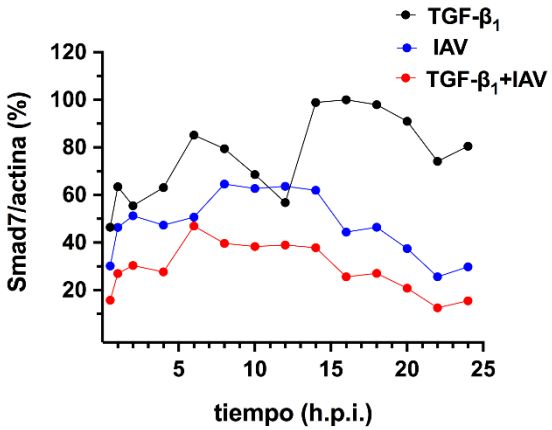


FIGURA 31. LA INFECCIÓN CON IAV INCREMENTA LA ABUNDANCIA RELATIVA DE SMAD-7.

Gráfico de abundancia relativa mediante análisis de densitometría de Smad-7, muestran diferencias desde 0.5 hasta 24 hpi.

VI.6 EFECTO DE TGF-β1 COMO TRATAMIENTO POSTERIOR A LA INFECCIÓN POR IAV.

Con el objetivo de evaluar si el tiempo de la activación de la vía canónica de TGF-β1 es importante en la respuesta celular frente a la infección por IAV, se realizaron ensayos similares a los anteriores pero donde el tratamiento con TGF-β1 se realizó una hora después de la incubación con el virus de influenza (IAV+TGF-β1). De esta manera, se comparó la abundancia relativa de Smad-7 con respecto a la infección con IAV y con el pre-tratamiento con TGF-β1 (Figuras 32 y 33). Mientras que los resultados a los tiempos de 6, 12 y 24 hs, muestran un patrón relativamente similar si la incubación con TGF-β1 ocurre antes o despues de la

infección. Sin embargo, la cinética de activación durante 24 hs de infección (Figura 33), hace evidente la presencia de Smad-7 disminuye con el pre-tratamiento con la citocina, pero sí la estimulación es posterior a la infección, la presencia de Smad-7 presenta un patrón similar a la infección por IAV sola (Figura 32 y 33). Por ello, el análisis de abundancia relativa para Smad-7 en el tratamiento IAV+TGF-β_1 permite mostrar que no hay cambios notable entre la infección y el tratamiento posterior con TGF-β_1 (Figura 34).

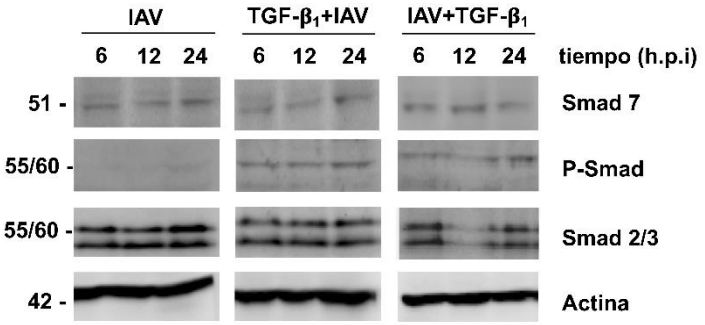


FIGURA 32. EL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 POSTERIOR A LA INFECCIÓN CON IAV,, MANTIENE EL PERFIL DE DE APARICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE SMAD-2/3 CON RESPECTO A LA INFECCIÓN POR IAV.

Se detectó mediante ensayo de western blot a Smad-2/3 y su forma fosforilada, así como la presencia de Smad-7, en lisados de células A549 bajo las diferentes condiciones de tratamientos, IAV, TGF-β_1+IAV e IAV+ TGF-β_1 a 6, 12 y 24 hpi, para verificar los cambios relacionados con la fosforilación de Smad-2/3 y Smad-7.

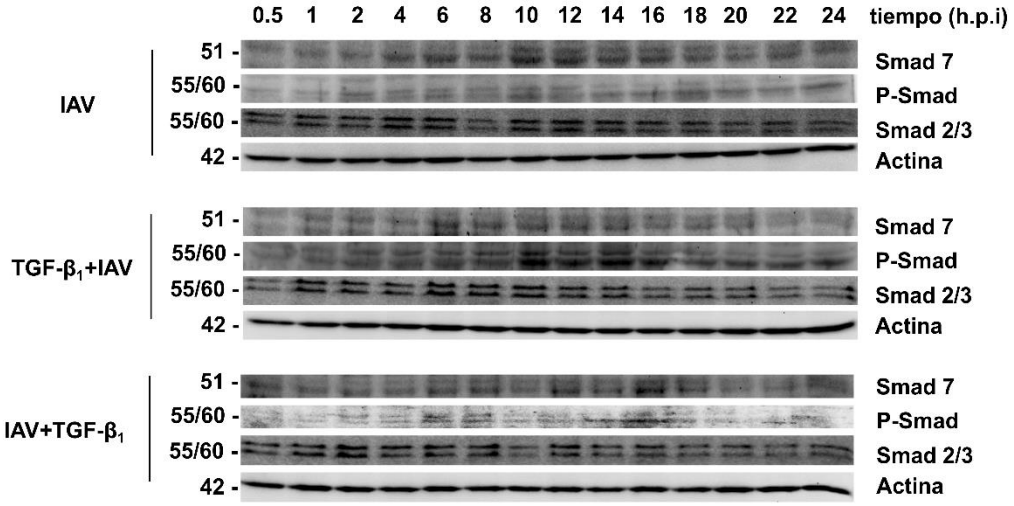


FIGURA 33. EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 DESPUÉS DE LA INFECCIÓN POR IAV MANTIENE EL PERFIL DE APARICIÓN DE SMAD-7.

Se detectó mediante ensayo de western blot Smad-2/3 y su forma fosforilada, así como la presencia de Smad-7, una proteina inhibitoria de la vía, en lisados de células A549 bajo las diferentes condiciones de tratamientos desde 0.5 hasta 24 hpi.

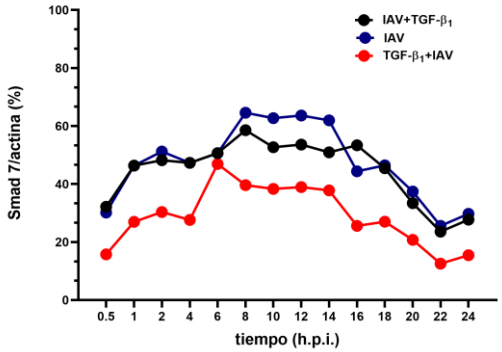


FIGURA 34. EL PERFIL DE APARICIÓN DE SMAD-7 DE LOS TRATAMIENTOS IAV Y DE IAV + TGF-β_1 NO SE MODIFICA.

Gráfico de abundancia relativa mediante análisis de densitometría de Smad-7 muestran diferencias desde 0.5 hasta 24 hpi entre las 3 condiciones de estudio.

Finalmente, al comparar la presencia de la proteína M1 por el tratamiento con TGF-β_1 antes y después de la infección viral (Figura 35), muestra que el perfil y nivel de expresión fue muy similar durante la condición de infección por IAV e incubación con TGF-β_1 posterior a la infección viral. Por su parte, como se había descrito previamente, la incubación de TGF-β_1 previo a la infección induce un retraso en el tiempo de expresión y disminución de la presencia de la proteína viral. Con el fin de facilitar la comparación del ensayo de inmunodetección para la proteína viral M1, se realizó un análisis de abundancia relativa para esta proteína (Figura 36), confirmando que no existen diferencias en la cinética de abundancia, en comparación con la infección por IAV y con IAV+TGF-β_1. Esto nos permite concluir que el orden de la estimulación con TGF-β_1, parece ser muy relevante en el efecto antiviral y anti-apoptótico observado en nuestro modelo de estudio.

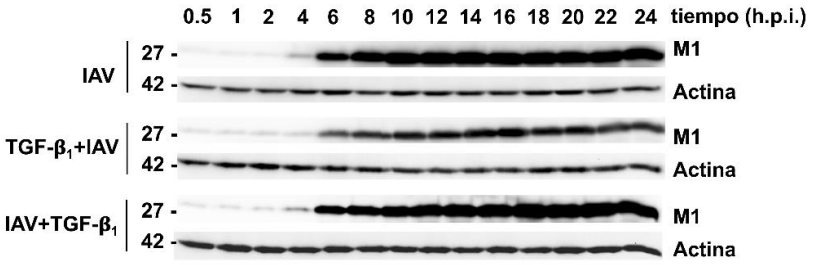


FIGURA 35. EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TGF-β_1 POSTERIOR A LA INFECCIÓN POR IAV MANTIENE EL PERFIL DE APARICIÓN DE M1 COMPARADO CON LA INFECCIÓN POR IAV.

Se detectó mediante ensayo de western blot M1 en lisados de células A549 bajo las diferentes condiciones de tratamientos desde 0.5 hasta 24 hpi.

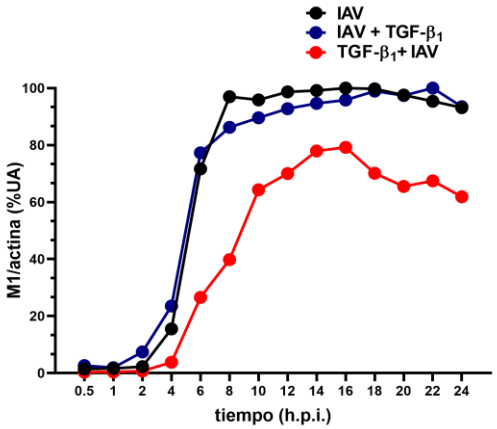


FIGURA 36. EL PERFIL DE APARICIÓN DE M1 DE LOS TRATAMIENTOS IAV Y DE IAV+TGF-β_1 NO SE MODIFICA.

Gráfico de abundancia relativa mediante análisis de densitometría de M1 desde 0.5 hasta 24 hpi en lisados de células A549, que demuestra que la adición posterior a la infección de TGF-β_1 no modifica el perfil de aparicion de la proteína M1 con respecto a la infección por IAV por si sola.

VII. DISCUSIÓN.

Varios estudios previos han evidenciado que para generar una respuesta antiviral eficaz, los elementos tanto inmunológicos como no-inmunológicos participan para alterar el programa de la infección viral [73, 96, 97]. En este sentido, nuestro presente modelo de estudio, permitió analizar los elementos propios de la célula ante la infección viral. Con esa idea y, con base en la literatura, nos interesó evaluar el efecto del TGF-β_1 en la respuesta celular durante la infección por IAV, ya que la tolerancia inmunológica ante la presencia de un patógeno es una estrategia de defensa del hospedero, permitiendo, eventualmente, un mejor control de la inflamación y, por lo tanto, limitar la inmunopatología y el daño tisular asociado a la infección por el virus [73].

En su conjunto, los resultados de este estudio sugieren que la activación de la vía canónica de TGF-β_1 previo a la infección por IAV, modifica la respuesta celular y la replicación del virus. Como se ha descrito, TGF-β_1 es una citocina que se secreta como una proteína inactiva y requiere un procesamiento proteolítico para su completa activación, pudiendo permanecer inactiva en la matriz extracelular, incluso en el caso de tejido pulmonar [1, 3, 4, 15]. Por eso resulta interesante los estudios que muestran que TGF-β_1 puede activarse como consecuencia de su interacción con la proteína viral NA, al cortar el residuo AS localizado en su peptido de latencia que mantiene a esta citocina inactiva [87]. Como se sabe, los residuos de AS juegan un papel importante en la diseminación del virus, ya que la actividad enzimática de la NA permite la liberación de los viriones unidos a la superficie de células infectadas y facilita su diseminación a través del tracto respiratorio. En ese sentido, *Carlson, et al.*, evidenciaron que TGF-β_1 podría activarse debido a la actividad NA de diversas cepas de IAV [88]. En ese contexto, ratones infectados con IAV e inoculados por via intranasal con un vector adenoviral para la expresión de TGF-β_1, provocó una disminución de los títulos virales en lisados pulmonares y la reducción en la mortalidad de los ratones infectados e inoculados con TGF-β_1 comparado con ratones únicamente infectados [88]. Todo lo anterior, parece sugerir que la presencia de TGF-β_1 ejerce un papel inhibitorio en la respuesta frente a la infección por IAV *in vivo*.

Muchos estudios muestran que el momento de liberación y activacion de TGF-β_1 asi como el tipo celular que lo produce, parece ser fundamental en el desenlance de la enfermedad causada por influenza. Dado que durante la infección natural por IAV, las células epiteliales son las primeras células en ser infectadas, por ello, en nuestro modelo *in vitro,* con las células A549, se evaluó el efecto directo de TGF-β_1 sobre las consecuencias de la infección por IAV. Anteriormente, *Denney et al.*, mostraron la importancia del tiempo de aparición de TGF-β_1 y de INF-β producido por células epiteliales en ratones infectados con la cepa de IAV H3N2, indicando que estas citocinas determinan el curso y el desenlace de la enfermedad causada por el virus. De esa manera, la secreción y activación de TGF-β_1 en ese trabajo, ocurrió a 12 hpi, mientras que la

presencia de IFN-β despues de 48 hpi. Empleando ese sistema, los ratones deficientes para TGF-β_1 mostraron un incremento de IFN-β a las 24 hpi, sugiriendo que TGF-β_1 induce cambio en la temporalidad de la respuesta celular epitelial frente a la infección por IAV [98]. Por su parte, en nuestro modelo *in vitro*, se mostró que el pre-tratamiento con TGF-β_1 indujo un retraso y una reducción en la abundancia relativa de la proteína M1 con respecto a las células que sólo fueron infectadas (Figura 18). Adicionalmente, estos resultados fueron corroborados al evaluar las partículas víricas infectivas mediante ensayos de unidades formadoras de foco (uff/ml) de sobrenadantes de células A549 (Figura 19).

Por otro lado, el papel benéfico de la presencia de TGF-β_1 fue observado en un modelo murino con asma. En estas condiciones ratones asmáticos por OVA mostraron resistencia a la infección por H1N1 IAV. Al evaluar los tejidos pulmonares se observó un fuerte incremento en los niveles de TGF-β_1, exhibiendo una reducción tanto de citocinas inflamatorias, así como de proteínas totales y citotoxicidad en las vías respiratorias, indicadores de una disminución de la lesión tisular. De esa manera, los autores sugirieron que el efecto no dependió del ciclo de replicación del virus, sino del perfil inflamatorio de los animlaes, ya que un aumento transitorio en la expresión de TGF-β_1 después del asma agúda puede inducir protección contra la inmunopatología inducida por influenza [89]. Adicionalmente, en el mismo estudio, empleando un ratón knockout condicionado para el receptor TβRII, se observó que la perdida funcional de este receptor impactó en la resistencia a la infección por IAV [89]. Otros estudios también han sugerido que el TGF-β_1, ya sea por su aplicación recombinante [99], por la estimulación de macrófagos alveolares con IL-6 [100] o por la expresión de ADAP en linfocitos T CD8+ [101], puede inducir efectos benéficos sobre la infección por IAV. Por ello, los resultados de este trabajo enfatizan la importancia de la expresión y activación del TGF-β_1 para modular la respuesta antiviral.

Otra respuesta celular de relevancia en la infección por IAV, es la apoptosis, ya que es un proceso celular involucrado en la modulación de la patogénesis por influenza [72], aunque sus consecuencias en el curso de la infección son aún controversiales [78, 102-105]. Primeramente, nuestros resultados mostraron que la pre-incubación con TGF-β_1 ocasiona una fuerte inhibición del proceso de apoptosis, lo cual significó una reducción de la mayoría de los marcadores pro-apoptóticos evaluados, al comparar con las células sólo infectadas por IAV (Figuras 14 y 16). Asimismo, nuestros ensayos permiten establecer una relación novedosa entre la inhibición de apoptosis y la activación de la vía canónica del TGF-β_1: la inhibición de la apoptosis coincidió con activación por fosforilación de Smad-2/3, mientras que la apoptosis inducida por IAV parece coincidir con incremento en presencia relativa de Smad-7 (Figura 14). De esa manera, en nuestro modelo de estudio, sugerimos que el balance entre la fosforilación de Smad-2/3 y la

presencia de Smad-7 pueden ser elementos activos en la respuesta celular en las primeras horas post-infección por IAV. A ese respecto, se conoce muy bien que Smad-7 es una proteína inhibitoria de la vía canónica de TGF-β_1 [106], pero se desconoce su relevancia en las infecciones virales, en particular por IAV. Estudios realizados en modelos de cancer gástrico y de seno, han relacionado la expresión y presencia de Smad-7 con la inducción de apoptosis [106-108].

Por otro lado, cada vez hay más pruebas de la interrelación entre la muerte celular y las vías inflamatorias, por lo que una mayor comprensión de su papel en la defensa y la respuesta inflamatoria puede facilitar el diseño de nuevos tratamientos para controlar la respuesta inflamatoria del hospedero ante infección por influenza, permitiendo eventualmente un mejor manejo de casos graves de la patología. Una importante respuesta generada por la célula como consecuencia de la infección por IAV, es la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1β, como se demostró en ratones deficientes en la activación del inflamosoma que, ante la infección por IAV, presentaron capacidad respiratoria reducida, necrosis pulmonar y una alta mortalidad con respecto a ratones control [109]. Adicionalmente, se demostró que en condrocitos humanos la sobre-expresión de Smad-7, se relaciona con un aumento en los niveles de IL-1β mediante un mecanismo dependiente de NF-κB [110]. En ese contexto, estos resultados sugieren una posible asociación entre el incremento de los niveles de Smad-7 y la activación del inflamosoma, como parece observarse en los resultados del presente estudio.

En conjunto con esta última información y los resultados de este trabajo, estas observaciones ofrecen una posible explicación de la presencia de Smad-7 en paralelo con la activación del inflamosoma en el curso de la infección por IAV (Figura 22 y 23), y como el aumento de la abundancia relativa de la forma fosforilada de Smad-2/3 reduce de manera significativa la concentración de IL-1β y la apoptosis de células infectadas por IAV.

En la Figura 37 se resumen los elementos más sobresalientes de este estudio. Por un lado, se mostraron evidencias que la infección por IAV *in vitro* incrementa la abundancia relativa de Smad-7, lo cual sugerimos, podría inducir, por un lado, una respuesta inflamatoria (activación de caspasa-1 y secreción de IL-1β) y, por otro lado, la apoptosis de células infectadas. Con base a antecedentes de la literatura, se propone que este efecto pueda estar inducido mediante el factor de transcripción NF-κB [110]. Asociado a esta información, estudios recientes sugieren que IRF3 puede interactuar con Smad-3, gracias a la homología estructural que ambas proteínas presentan. En esta lógica, IRF-3 podría impedir la activación de Smad-3 debido a la fosforilación por el receptor TβRI [90]. Estudios previos han mostrado que dentro de los varias respuestas celulares, la infección por IAV induce la activación de IRF3 como consecuencia de la respuesta innata por

interferones de tipo I. En estas condiciones, se podría sugerir que la presencia de IRF3 podría suprimir la vía canónica inducida por TGF-β1, al impedir su fosforilación. Por su parte, el pre-tratamiento con TGF-β1 ocasionaría la activación por fosforilación de Smad-2/3 y retrasaría la aparición de Smad-7, favoreciendo por un lado, la sobrevivencia celular y, por otro lado, la reducción de la activación de caspasa-1 e IL-1β y, potencialmente, una posible respuesta pro-inflamatoria. Por otra parte, la activación de la vía canonica, por algún mecanismo aún desconocido, afectarían la cinética de replicación viral y síntesis de proteínas virales, lo cual, posibilitaría una disminución en la producción de particulas virales (uff/ml).

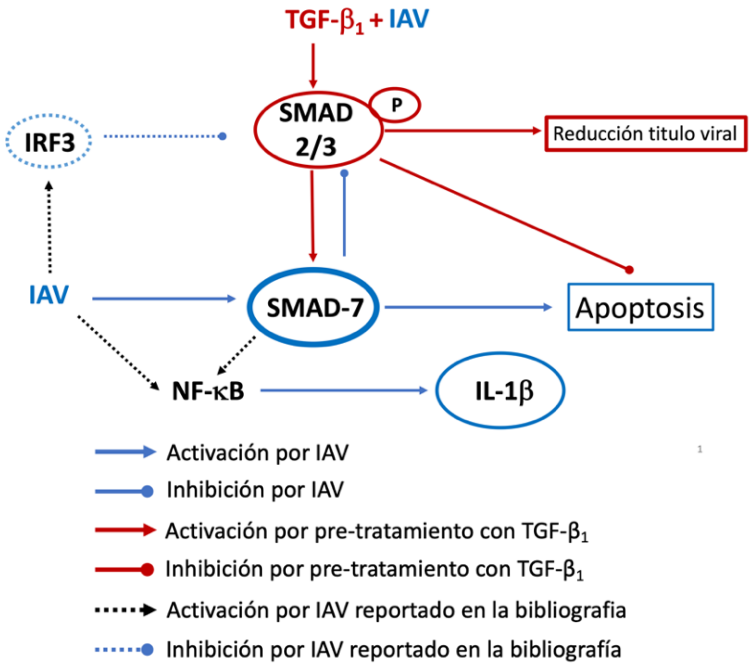


FIGURA 37. SMAD-7 SE RELACIONA CON LOS EFECTOS DEL VIRUS SOBRE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS A549.

Debido a la infección con IAV, las células epiteliales inducen Smad-7, relacionándose en las respuestas celulares de inducción de apoptosis, secreción de IL-1β y la replicación del virus, toda vez que ya se ha reportado la participación de esta proteína inhibitoria de la vía canónica con NF-κB e IRF3 en el contexto IAV. Por esta razón, la activación de la vía canónica, debido al pre-tratamiento con TGF-β1, se reduce la presencia de Smad-7 favoreciendo los efectos anti-apoptóticos, anti-inflamatorios y anti-viral. En color rojo se indica los resultados obtenidos en este trabajo debido al pre-tratamiento con TGF-β1 y en azul los resultados asociados con la infección con IAV en el modelos celular A549.

Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados mediante estudios *in vitro* e *in vivo* directamente vinculados a evaluar el efecto de silenciar la expresión de Smad-7 sobre la infección por IAV.

Adicionalmente, aunque no necesariamente vinculados con la vía de Smad, otros estudios han mostrado que elementos de la vía de señalización inducida por TGF-β_1 [36], podrían interaccionar con proteínas viral como en hepatitis C [111], virus de fiebre amarilla [112] y HIV [113]. Asimismo, los resultados de este trabajo, también enfatizan la idea de que el momento en que se sintetiza, secreta y activa TGF-β_1 es importante en el resultado patológico del hospedero, favoreciendo la respuesta inmune pulmonar y limitando los efecto pro-virales.

VII.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los presentes resultados ofrecen una descripción limitada del proceso de infección, dado que no comprende el papel que cumplen las respuesta inmune innata y adaptativa para el curso del ciclo replicativo del IAV y menos sobre la patología. En ese sentido, una de las más importantes limitaciones de este estudio fue la ausencia de estudios *in vivo*, ya sea en modelos murinos o mediante evaluación de muestras clínicas.

Es importante considerar ensayos de muerte celular que ayuden a entender si este proceso favorece la respuesta anti-viral de TGF-β_1 a través de la activación de su vía de señalización canónica, toda vez que se sabe que la activación diversos mecanismos de muerte celular favorecen el reconocimiento de PAMPS, la erradicación efectiva de IAV y la patogénesis causada por IAV [114]. Estudios basados en la inmunodetección de caspasa-3, así como otros marcadores de fragmentación de ADN como ensayos de TUNEL, permitirán verificar el efecto anti-apoptótico de TGF-β_1 visualizado en este trabajo. Además, será importante hacer estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, utilizando virus inactivado (iIAV), no sólo como una estrategia de control experimental, sino también para disectar si los PAMPS asociados a la partícula vírica junto con el estímulo de TGF-β_1, pudieran modular la vía canónica de TGF-β_1 en las condiciones de estudio.

Siguiendo este mismo contexto, en el presente trabajo se realizaron análisis de inmunodetección por western blot, pero será importante confirmar sí la activación de la vía canónica de TGF-β_1 podría ser un mecanismo de defensa antiviral aún en células ya infectadas, a pesar de la presencia de inhibidores de la vía tales como Smad7 o hipoteticamente IRF3. Este análisis sería importante realizarlo por citometría de flujo discriminando entre células infectadas y no infectadas y evaluando por tinción intracelular las proteínas intracelulares relacionadas con la vía canónica de TGF-β_1, así como de marcadores específicos de muerte celular en diversos modelos de células epiteliales, como pudiera ser células NHBE, células normales de epitelio bronquial (ATCC: CRL-2741), así como cultivos celulares primarios derivados de modelo murino, que permitan comparar el efecto de infección con la línea A549, modelo de estudio de este trabajo.

Varios estudios han mostrado que la infección por IAV modifica tanto el perfil de expresión como la síntesis de proteínas, por lo que será importante describir las modificaciones en el perfil de expresión de proteínas relacionadas con las cascadas de señalización del TGF-β_1. De esa manera, estudios mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real y proteómicos confirmará si el incremento de la fosforilación de Smad-2/3 por el pre-tratamiento con TGF-β_1 ó de Smad-7 por la infección por IAV se deben a un aumento en la expresión, transcripción y traducción de estas proteínas..

Se demostró que Smad-7 podria participar en los efectos celulares estudiados, por lo que será importante verificar mediante ensayos de silenciamiento selectivo, por técnicas de ARN de interferencia o CRISP-Cas9, su impacto sobre la infección por IAV y posible impacto sobre los eventos de la respuesta celular. Entre los principales efectos a estudiar, el análisis de citocinas por multiplex como INF-β e IL-6 que participan en la respuesta antiviral e inflamatoria, favorecerá en la confirmación de los efectos sobre Smad-7.

Dentro de los resultados relevantes de este trabajo, la reducción de partículas vírales formadoras de foco debido al pre-tratamiento con TGF-β_1 sugiere un efecto antiviral para esta citocina, por lo que ensayos de co-precipitación de IRF-3 y Smad-3, permitirán confrontar nuestra hipótesis de que Smad-7 induce un papel activo durante la infección por IAV. Por su parte, la transfección con el plásmido que expresa NS1 en células A549, posibilitará evaluar su efecto sobre la respuesta antiviral, la fosforilación de Smad-2/3 y la síntesis de interferones como IFN-β. En términos generales, será una manera muy controlada para caracterizar las interacciones de proteínas durante el pre-tratamiento con TGF-β_1 y uno de los inductores principales del IAV (NS1) para el control de la infección celular.

Si bien, fue importante el uso del microarreglo de proteínas relacionadas con muerte celular para el presente estudio, será importante caracterizar el mecanismo por el cual TGF-β_1 pudiera modificar la expresión de proteínas pro-apoptóticas. Estudios previos han mostrado que la proteína HSP70 se une a las proteínas PB1/PB2, incrementando la velocidad de replicación del virus en el núcleo, e induciendo la degradación del receptor TβRI por el proteosoma; además HSP70 reduce la actividad de los genes de respuesta a NF-κB [115], por lo que será importante realizar estudios de transfección de algunas proteínas relevantes estudiadas en el microarreglo de apoptosis para verificar su relación con elementos de la señalización de TGF-β_1 y la infección por IAV. Finalmente, el silencimiento selectivo de proteínas de la vía canónica para TGF-β_1 (inhibidor para Smad-3), así como del los receptores TβRI y TβRII permitirán confirmar los resultados de este trabajo.

VIII. CONCLUSION.

La relevancia de los resultados del presente estudio sugieren que TGF-β_1 parece modular la respuesta celular a la infección por el virus de influenza A, como consecuencia de activación de su via de señalizacion canónica previo a la incubación con el virus. Este evento parece inducir un efecto antiviral, inhibiendo factores vinculados con la apoptosis, la replicación viral y la activación del inflamasoma. Estos resultados parecen además sugerir que los eventos coinciden con la activación por fosforilación de Smad-2/3 y la reducción de los niveles de Smad-7, en el pre-tratamiento con TGF-β_1. En este sentido, este trabajo sugiere que la infección por el virus influenza promueve el incremento de los niveles de la Smad-7 y, por lo tanto, inhibe los efectos anti-inflamatorios potencialmente inducidos por la citocina.

Por esta razón, estudios de interacción entre proteínas celulares asociadas a la infección por el virus influenza, así como de otros virus respiratorios, con proteinas de la vía de señalización canónica para TGF-β_1 y la asociación con los receptores por el dominio cinasa del receptor TβRI para TGF-β_1, pudieran ayudarnos a generar nuevos compuestos con capacidad anti-inflamatoria, u objetivos terapéuticos que controlen la presencia de Smad-7 en las infecciones por IAV y que regulen la respuesta inmunológica frente a la infección viral, manteniendo un equilibrio entre resistencia y tolerancia.

IX. PERSPECTIVAS

1. Silenciamiento selectivo de posibles moduladores de la respuesta anti-viral del TGF-β_1, por ejemplo, Smad-7.
2. Confirmar estos resultados mediante su realización en un modelo in vivo.
3. Confirmar posible relación causal entre la apoptosis celular e inducción de inflamosoma.

X. BIBLIOGRAFIA.

1. Li, M.O., et al., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 99-146.
2. Garcia-Sainz, J.A., et al., [Receptors and functions of TGF-beta, a crucial cytokine in wound healing]. Gac Med Mex, 2003. 139(2): p. 126-43.
3. Massague, J., TGF-beta signaling in development and disease. FEBS Lett, 2012. 586(14): p. 1833.
4. Macías-Silva, M.S.-G.y.M., EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA: FUNCIONES Y VI□AS DE TRANSDUCCIO□N. REB, 2004. 23(1): p. 3-11.
5. Tirado-Rodriguez, B., et al., TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. J Immunol Res, 2014. 2014: p. 318481.
6. Wrana, J.L., et al., Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature, 1994. 370(6488): p. 341-7.
7. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser, Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. 22: p. 159-80.
8. Chen, Y.G., Endocytic regulation of TGF-beta signaling. Cell Res, 2009. 19(1): p. 58-70.
9. Gougos, A. and M. Letarte, Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. J Biol Chem, 1990. 265(15): p. 8361-4.
10. Lopez-Casillas, F., J.L. Wrana, and J. Massague, Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. Cell, 1993. 73(7): p. 1435-44.
11. Macias, M.J., P. Martin-Malpartida, and J. Massague, Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling. Trends Biochem Sci, 2015. 40(6): p. 296-308.
12. Taylor, A.W., Review of the activation of TGF-beta in immunity. J Leukoc Biol, 2009. 85(1): p. 29-33.
13. Derynck, R. and Y.E. Zhang, Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature, 2003. 425(6958): p. 577-84.
14. Yan, X., X. Xiong, and Y.G. Chen, Feedback regulation of TGF-beta signaling. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018. 50(1): p. 37-50.
15. Tzavlaki, K. and A. Moustakas, TGF-beta Signaling. Biomolecules, 2020. 10(3).
16. Sanjabi, S., S.A. Oh, and M.O. Li, Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. 9(6).
17. Aluwihare, P. and J.S. Munger, What the lung has taught us about latent TGF-beta activation. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. 39(5): p. 499-502.
18. Aschner, Y. and G.P. Downey, Transforming Growth Factor-beta: Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016. 54(5): p. 647-55.
19. Travis, M.A. and D. Sheppard, TGF-beta activation and function in immunity. Annu Rev Immunol, 2014. 32: p. 51-82.
20. Ming, M., M.E. Ewen, and M.E. Pereira, Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. Cell, 1995. 82(2): p. 287-96.
21. Silva, J.S., D.R. Twardzik, and S.G. Reed, Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). J Exp Med, 1991. 174(3): p. 539-45.
22. DePaolo, R.W., et al., A specific role for TLR1 in protective T(H)17 immunity during mucosal infection. J Exp Med, 2012. 209(8): p. 1437-44.
23. Beswick, E.J., et al., Role of gastric epithelial cell-derived transforming growth factor beta in reduced CD4+ T cell proliferation and development of regulatory T cells during Helicobacter pylori infection. Infect Immun, 2011. 79(7): p. 2737-45.
24. Scholzen, A., et al., Plasmodium falciparum-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. PLoS Pathog, 2009. 5(8): p. e1000543.
25. Spaccapelo, R., et al., TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with Candida albicans. J Immunol, 1995. 155(3): p. 1349-60.
26. Tinoco, R., et al., Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. Immunity, 2009. 31(1): p. 145-57.

27. Rowan, A.G., et al., Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. J Immunol, 2008. 181(7): p. 4485-94.
28. Marek, A., et al., TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? Med Sci Monit, 2002. 8(7): p. RA145-51.
29. Karimi-Googheri, M., et al., Important roles played by TGF-beta in hepatitis B infection. J Med Virol, 2014. 86(1): p. 102-8.
30. Yao, J., et al., lncRNA-HEIM Facilitated Liver Fibrosis by Up-Regulating TGF-beta Expression in Long-Term Outcome of Chronic Hepatitis B. Front Immunol, 2021. 12: p. 666370.
31. Dai, C.Y., et al., Association between transforming growth factor-beta 1 polymorphism and virologic characteristics of chronic hepatitis C. Transl Res, 2008. 152(4): p. 151-6.
32. Wiercinska-Drapalo, A., et al., Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. Viral Immunol, 2004. 17(1): p. 109-13.
33. Chen, S., et al., Transforming growth factor-beta1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1alpha-stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1 entry in human monocyte-derived macrophages. Immunology, 2005. 114(4): p. 565-74.
34. Wang, J., et al., Synergistic induction of apoptosis in primary CD4(+) T cells by macrophage-tropic HIV-1 and TGF-beta1. J Immunol, 2001. 167(6): p. 3360-6.
35. Pion, M., et al., HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. AIDS, 2013. 27(13): p. 2019-29.
36. Mirzaei, H. and E. Faghihloo, Viruses as key modulators of the TGF-beta pathway; a double-edged sword involved in cancer. Rev Med Virol, 2018. 28(2).
37. Hondermarck, H., N.W. Bartlett, and V. Nurcombe, The role of growth factor receptors in viral infections: An opportunity for drug repurposing against emerging viral diseases such as COVID-19? FASEB Bioadv, 2020. 2(5): p. 296-303.
38. McCann, K.L. and F. Imani, Transforming growth factor beta enhances respiratory syncytial virus replication and tumor necrosis factor alpha induction in human epithelial cells. J Virol, 2007. 81(6): p. 2880-6.
39. Fukuda, M., H. Kurosaki, and T. Sairenji, Loss of functional transforming growth factor (TGF)-beta type II receptor results in insensitivity to TGF-beta1-mediated apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. J Med Virol, 2006. 78(11): p. 1456-64.
40. French, D., et al., Expression of HPV16 E5 down-modulates the TGFbeta signaling pathway. Mol Cancer, 2013. 12: p. 38.
41. Tarakanova, V.L. and W.S. Wold, Transforming growth factor beta1 receptor II is downregulated by E1A in adenovirus-infected cells. J Virol, 2003. 77(17): p. 9324-36.
42. Beckham, J.D., K. Tuttle, and K.L. Tyler, Reovirus activates transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein signaling pathways in the central nervous system that contribute to neuronal survival following infection. J Virol, 2009. 83(10): p. 5035-45.
43. Yeung, M.L., et al., MERS coronavirus induces apoptosis in kidney and lung by upregulating Smad7 and FGF2. Nat Microbiol, 2016. 1: p. 16004.
44. Zhao, X., J.M. Nicholls, and Y.G. Chen, Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid protein interacts with Smad3 and modulates transforming growth factor-beta signaling. J Biol Chem, 2008. 283(6): p. 3272-3280.
45. Wang, C.Y., et al., SARS coronavirus papain-like protease up-regulates the collagen expression through non-Samd TGF-beta1 signaling. Virus Res, 2017. 235: p. 58-66.
46. Seo, T., J. Park, and J. Choe, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IFN regulatory factor 1 inhibits transforming growth factor-beta signaling. Cancer Res, 2005. 65(5): p. 1738-47.
47. Syed, V., TGF-beta Signaling in Cancer. J Cell Biochem, 2016. 117(6): p. 1279-87.
48. Colak, S. and P. Ten Dijke, Targeting TGF-beta Signaling in Cancer. Trends Cancer, 2017. 3(1): p. 56-71.
49. Liu, R., et al., Influenza D virus. Curr Opin Virol, 2020. 44: p. 154-161.
50. Baltimore, D., Viral genetic systems. Trans N Y Acad Sci, 1971. 33(3): p. 327-32.
51. Sederdahl, B.K. and J.V. Williams, Epidemiology and Clinical Characteristics of Influenza C Virus. Viruses, 2020. 12(1).

52. Krammer, F., et al., Influenza. Nat Rev Dis Primers, 2018. 4(1): p. 3.
53. Liu, Q., Y.H. Zhou, and Z.Q. Yang, The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. Cell Mol Immunol, 2016. 13(1): p. 3-10.
54. Van Kerkhove, M.D., et al., Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. PLoS Med, 2011. 8(7): p. e1001053.
55. Karlsson, E.A., et al., A Perfect Storm: Increased Colonization and Failure of Vaccination Leads to Severe Secondary Bacterial Infection in Influenza Virus-Infected Obese Mice. mBio, 2017. 8(5).
56. Ciancanelli, M.J., et al., Infectious disease. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. Science, 2015. 348(6233): p. 448-53.
57. Kim, H., R.G. Webster, and R.J. Webby, Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. Viral Immunol, 2018. 31(2): p. 174-183.
58. Sanjuan, R. and P. Domingo-Calap, Mechanisms of viral mutation. Cell Mol Life Sci, 2016. 73(23): p. 4433-4448.
59. Javanian, M., et al., A brief review of influenza virus infection. J Med Virol, 2021. 93(8): p. 4638-4646.
60. Yamayoshi, S. and Y. Kawaoka, Current and future influenza vaccines. Nat Med, 2019. 25(2): p. 212-220.
61. Perez, D.R., et al., Land-based birds as potential disseminators of avian mammalian reassortant influenza A viruses. Avian Dis, 2003. 47(3 Suppl): p. 1114-7.
62. Chan, L., et al., Review of Influenza Virus Vaccines: The Qualitative Nature of Immune Responses to Infection and Vaccination Is a Critical Consideration. Vaccines (Basel), 2021. 9(9).
63. Vincent, A., et al., Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. Zoonoses Public Health, 2014. 61(1): p. 4-17.
64. Chen, Y., et al., Emergence and Evolution of Novel Reassortant Influenza A Viruses in Canines in Southern China. mBio, 2018. 9(3).
65. Tumpey, T.M., et al., Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science, 2005. 310(5745): p. 77-80.
66. Taubenberger, J.K., et al., Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature, 2005. 437(7060): p. 889-93.
67. Garten, R.J., et al., Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science, 2009. 325(5937): p. 197-201.
68. Smith, G.J., et al., Dating the emergence of pandemic influenza viruses. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(28): p. 11709-12.
69. Ma, W., A. Garcia-Sastre, and M. Schwemmle, Expected and Unexpected Features of the Newly Discovered Bat Influenza A-like Viruses. PLoS Pathog, 2015. 11(6): p. e1004819.
70. Hirst, G.K., Studies of Antigenic Differences among Strains of Influenza a by Means of Red Cell Agglutination. J Exp Med, 1943. 78(5): p. 407-23.
71. Yamada, S., et al., Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. Nature, 2006. 444(7117): p. 378-82.
72. Lowy, R.J., Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. Int Rev Immunol, 2003. 22(5-6): p. 425-49.
73. Iwasaki, A. and P.S. Pillai, Innate immunity to influenza virus infection. Nat Rev Immunol, 2014. 14(5): p. 315-28.
74. Laghlali, G., K.E. Lawlor, and M.D. Tate, Die Another Way: Interplay between Influenza A Virus, Inflammation and Cell Death. Viruses, 2020. 12(4).
75. Ramos, I., et al., Innate Immune Response to Influenza Virus at Single-Cell Resolution in Human Epithelial Cells Revealed Paracrine Induction of Interferon Lambda 1. J Virol, 2019. 93(20).
76. Min, J.Y. and R.M. Krug, The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(18): p. 7100-5.
77. Conenello, G.M. and P. Palese, Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. Cell Host Microbe, 2007. 2(4): p. 207-9.
78. Lee, S., et al., Influenza A Virus Infection Triggers Pyroptosis and Apoptosis of Respiratory Epithelial Cells

through the Type I Interferon Signaling Pathway in a Mutually Exclusive Manner. J Virol, 2018. 92(14).
79. Schultz-Cherry, S., et al., Examining the cellular pathways involved in influenza virus induced apoptosis. Avian Dis, 2003. 47(3 Suppl): p. 968-71.
80. Imre, G., Cell death signalling in virus infection. Cell Signal, 2020. 76: p. 109772.
81. Nogales, A., et al., Modulation of Innate Immune Responses by the Influenza A NS1 and PA-X Proteins. Viruses, 2018. 10(12).
82. Jagger, B.W., et al., An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. Science, 2012. 337(6091): p. 199-204.
83. Klemm, C., et al., Immunomodulatory Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses. Trends Microbiol, 2018. 26(7): p. 624-636.
84. Bermejo-Martin, J.F., et al., Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. Crit Care, 2009. 13(6): p. R201.
85. Periolo, N., et al., Pregnant women infected with pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus showed differential immune response correlated with disease severity. J Clin Virol, 2015. 64: p. 52-8.
86. Rendon-Ramirez, E.J., et al., TGF-beta Blood Levels Distinguish Between Influenza A (H1N1)pdm09 Virus Sepsis and Sepsis due to Other Forms of Community-Acquired Pneumonia. Viral Immunol, 2015. 28(5): p. 248-54.
87. Schultz-Cherry, S. and V.S. Hinshaw, Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. J Virol, 1996. 70(12): p. 8624-9.
88. Carlson, C.M., et al., Transforming growth factor-beta: activation by neuraminidase and role in highly pathogenic H5N1 influenza pathogenesis. PLoS Pathog, 2010. 6(10): p. e1001136.
89. Furuya, Y., et al., Prevention of Influenza Virus-Induced Immunopathology by TGF-beta Produced during Allergic Asthma. PLoS Pathog, 2015. 11(9): p. e1005180.
90. Xu, P., et al., Innate antiviral host defense attenuates TGF-beta function through IRF3-mediated suppression of Smad signaling. Mol Cell, 2014. 56(6): p. 723-37.
91. Shaw, M.L., et al., Cellular proteins in influenza virus particles. PLoS Pathog, 2008. 4(6): p. e1000085.
92. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
93. Brunelle, J.L. and R. Green, One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). Methods Enzymol, 2014. 541: p. 151-9.
94. Idziorek, T., et al., YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. J Immunol Methods, 1995. 185(2): p. 249-58.
95. Schultz-Cherry, S., et al., Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. J Virol, 2001. 75(17): p. 7875-81.
96. Schneider, D.S. and J.S. Ayres, Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. Nat Rev Immunol, 2008. 8(11): p. 889-95.
97. Ayres, J.S. and D.S. Schneider, Tolerance of infections. Annu Rev Immunol, 2012. 30: p. 271-94.
98. Denney, L. and L.P. Ho, The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. Biomed J, 2018. 41(4): p. 218-233.
99. Srivastava, V., et al., Resolution of immune response by recombinant transforming growth factor-beta (rTGF-beta) during influenza A virus infection. Indian J Med Res, 2012. 136(4): p. 641-8.
100. Woods, P.S., et al., TGF-beta-induced IL-6 prevents development of acute lung injury in influenza A virus-infected F508del CFTR-heterozygous mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. 308(11): p. L1136-44.
101. Li, N., et al., Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF-beta-mediated expression of host cell receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(1): p. 238-43.
102. Iwai, A., T. Shiozaki, and T. Miyazaki, Relevance of signaling molecules for apoptosis induction on influenza A virus replication. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 441(3): p. 531-7.
103. Stray, S.J. and G.M. Air, Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis. Virus Res, 2001. 77(1): p. 3-17.
104. Tripathi, S., et al., Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin. Cell Death Dis, 2013. 4:

p. e562.
105. Yan, Y., et al., The Novel H7N9 Influenza A Virus NS1 Induces p53-Mediated Apoptosis of A549 Cells. Cell Physiol Biochem, 2016. 38(4): p. 1447-58.
106. Briones-Orta, M.A., et al., Inhibitory Smad7: emerging roles in health and disease. Curr Mol Pharmacol, 2011. 4(2): p. 141-53.
107. Hu, Y., et al., Expression and function of Smad7 in autoimmune and inflammatory diseases. J Mol Med (Berl), 2021. 99(9): p. 1209-1220.
108. Jeon, W.K., et al., Smad7 sensitizes A549 lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through heme oxygenase-1 inhibition. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 420(2): p. 288-92.
109. Huang, C.H., et al., Caspase-1 deficient mice are more susceptible to influenza A virus infection with PA variation. J Infect Dis, 2013. 208(11): p. 1898-905.
110. Bauge, C., et al., Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes. Arthritis Rheum, 2008. 58(1): p. 221-6.
111. Cheng, P.L., et al., Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. Oncogene, 2004. 23(47): p. 7821-38.
112. Quaresma, J.A., et al., Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. Virology, 2006. 345(1): p. 22-30.
113. Poggi, A. and M.R. Zocchi, HIV-1 Tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B. Clin Dev Immunol, 2006. 13(2-4): p. 369-72.
114. Fujikura, D. and T. Miyazaki, Programmed Cell Death in the Pathogenesis of Influenza. Int J Mol Sci, 2018. 19(7).
115. Manzoor, R., et al., Heat shock protein 70 modulates influenza A virus polymerase activity. J Biol Chem, 2014. 289(11): p. 7599-614.

XI. ANEXOS.

ARTICULO PUBLICADO

Virus Research 297 (2021) 198337

Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

TGF-β1 signaling inhibit the *in vitro* apoptotic, infection and stimulatory cell response induced by influenza H1N1 virus infection on A549 cells

Genoveva BustosRivera-Bahena [a,c], Delia Vanessa López-Guerrero [b,d], Alicia Helena Márquez-Bandala [a,b], Fernando R. Esquivel-Guadarrama [b], Jose-Luis Montiel-Hernández [c,*]

[a] Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México
[b] Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México
[c] Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México
[d] Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Influenza A virus **(IAV)**
TGF-β1
Apoptosis
Smad7
Inflammasome
M1 viral protein
IL-1β

ABSTRACT

Influenza A virus (IAV) infection induces host cell responses that could derive in inflammatory and apoptotic response. In this respect, in multiple pathological situations, TGF-β1 has shown anti-inflammatory effect, but its role during IAV infection is poorly understood. Interestingly, recent profiling expression studies have suggested that the TGF-β1 pathway could be functionally related to the IAV infection's host response. To gain an understanding of the involvement of TGF-β1's signaling pathway during IAV infection, we compared different apoptotic proteins such as TNFR1, Fas ligand, XIAP, cIAP, among others proteins, and pro-inflammatory elements like IL-1β in the A549 cells during IAV infection (H1N1/NC/99), with and without 1 h of pre-treatment with TGF-β1. Pre-incubation with TGF-β1 significantly inhibited apoptosis and the presence of pro-apoptotic factors. Moreover, the relative abundance of immunodetected IAV M1 protein along 24 -h post-infection period was abridged, which correlated with a disminished infectious viral progeny Additionally, caspase 1 activation and increase of IL-1β induced by IAV infection was also reduced by TGF-β1 signaling activation. Whereas IAV infection increase of Smad-7 and, as consequence, partially inhibiting Smad2/3 phosphorylation, pre-treatment with TGF-β1 blocked IAV-dependent Smad7 induction and prevented Smad2/3 signaling shutdown. All these data suggest the role of TGF-β1 signaling pathway in the control of host cell response induced by the IAV infection and identify a potential clinical target to modulate acute cell death.

1. Introduction

Influenza A virus (IAV) infection induces a host cell stress associated inflammatory and apoptotic effect (Lee et al., 2018; Lowy, 2003; Roberson et al., 2012). Several studies employing *in vitro* and *in vivo* infection models have observed that apoptosis is a common cell host response (Lowy, 2003; Mehrbod et al., 2019). However, the biological mechanism and physiological implications are still a matter of controversy (El-Sayed et al., 2016; Lowy, 2003; Schultz-Cherry et al., 2003; Shim et al., 2017). In this respect, p53 (Dwivedi et al., 2016; Munoz--Fontela et al., 2011; Terrier et al., 2013; Turpin et al., 2005; Zhirnov and Klenk, 2007), heat shock proteins (Batra et al., 2016; Li et al., 2011; Manzoor et al., 2014) and caspases -1,-3,-7,-9 and -12 involvement (Mebratu et al., 2016; Stasakova et al., 2005; Wurzer et al., 2003) have been suggested. Furthermore, it has been observed that IAV infection is associated with inflammasome-dependent apoptosis or pyroptosis (Allen et al., 2009; Kuriakose and Kanneganti, 2017; Lee et al., 2018; Tate et al., 2016). Besides to the participation of host cellular proteins, some viral proteins as NS1 (Lowy, 2003; Schultz-Cherry et al., 2001; Zhang et al., 2011), M1 (Halder et al., 2011; Zhirnov et al., 2002), M2 (Ichinohe et al., 2010) and PB1/PB1-F2 (Jaworska et al., 2014; Pasricha et al., 2018; Takahashi et al., 2013) have been identified as inductors of apoptosis, playing a critical role during virus cycle replication and propagation.

Multiple studies have documented that IAV infection also induces a strong inflammatory response, *in vivo* and *in vitro,* mostly due to the

* Corresponding author at: José-Luis Montiel-Hernández, Facultad de Farmacia, UAEM, Av. Universidad 1001 col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
E-mail address: jlmontiel@uaem.mx (J.-L. Montiel-Hernández).

https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198337
Received 10 June 2020; Received in revised form 18 January 2021; Accepted 2 February 2021
Available online 10 February 2021
0168-1702/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

overabundant production of inflammatory cytokines and chemokines (Betakova et al., 2017; Jochems et al., 2018; Song et al., 2011). Inflammatory factors induced in lung epithelial A549 cell line model included cytokines (TNF, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-32, type I and II interferons) (Indalao et al., 2017; Li et al., 2008; Matikainen et al., 2006; Veckman et al., 2006), chemokines (IL-8, IP-10) (Bernasconi et al., 2005; Veckman et al., 2006) and iNOS (Li et al., 2009). Profiling expression (Chakrabarti et al., 2010; Mukherjee et al., 2011), proteomic (Coombs et al., 2010; Dove et al., 2012; Konig et al., 2010; Vester et al., 2009) and phospho-proteomic (Dove et al., 2012) studies using A549 cells infected by IAV have shown that diverse global pathways are affected during virus infection and replication, including cell metabolism and cell stress response.

On other hand, one important cytokine in the airways environment is TGF-β1. This cytokine belongs to a widely expressed family of cytokines with pleiotropic effects such as cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis. Several studies have confirmed the anti-inflammatory effects of TGF-β1 (Sheng et al., 2015), which includes a role during airway diseases (Moore et al., 2008; Saito et al., 2018). However, its role during IAV infection is poorly understood. Previous studies have suggested the direct participation of IAV at the TGF-β1 extracellular activation (Carlson et al., 2010; Schultz-Cherry and Hinshaw, 1996). Furthermore, functional proteomic studies have shown that the TGF-β1 pathway could be functionally related to the IAV infection's host response (Konig et al., 2010). The development of new strategies to control infection or inflammatory response requires a better knowledge of the molecular interactions between the virus and the host cell.

TGF-β1 signaling starts by binding of ligand to its transmembrane receptors type I and II receptors (TβRI and TβRII, respectively). One of them TβRI, has a kinase domain that can initiate the canonical pathway of TGF-β1, which is characterized by the activation of Smad proteins, specifically Smad2 and Smad3 by phosphorylation in serine-threonine residues. Activated phosphorylated Smad2/3 proteins join to Smad4 and transduce the signal from the plasma membrane into the nucleus where Smad and its transcriptional partners directly regulate gene expression. On the other hand, Smad7 is a member of Smad inhibitory proteins of the TGF-β1 pathway that is able to antagonize TGF-β1 signaling by direct interaction with the type I receptor.

Here, we show in A549 cells that TGF-β1 pre-treatment previous to the IAV infection and the signaling *via* a SMAD-dependent mechanism, significantly control the apoptosis as well as the inflammatory host cell response.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and virus

All the experiments for quantifying the virus were performed by using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC CCL-34). Cells were subcultured in Modified Eagle's (MEM), supplemented with 2 mM of L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone SH30071.03IH) and 1% antibiotics (Antibiotic/Antimycotic, Gibco). A549 cell line, derived from human alveolar epithelial carcinoma, was obtained from American Type Culture Collection (CCL-185). Cells were maintained in DMEM/F12 (Invitrogen) medium containing 10% FBS and 1% antibiotics.

A seasonal human influenza strain H1N1 (New Caledonia/99) was used and maintained in MDCK cells. Virus infectivity was assessed by titration in MDCK cells by plaque assay. Briefly, the MDCK cells were infected at confluency by serial dilutions of virus and incubated by one hour at 37 °C and 5% CO_2. After 1 h adsorption, the inoculum was removed and cells were incubated with MEM with noble agar (0.65%) and 2 μg/mL of L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin (TPCK trypsin, Sigma) during 48 h. Finally, the lytic plaques were counted by staining with violet crystal after 48 h post-infection.

2.2. Virus infection and stimulation with TGF-β1

A549 cells were grown in six well plates and incubated for 2 h in medium DMEM/F12 in absence of FBS prior treatments conditions. We studied four distinct conditions: control cells, incubation only with TGF-β1, IAV infected cells and pre-incubation with TGF-β1 followed by IAV infection. The cells were harvested at different time points.

Control conditions were cells without any treatment and maintained in growth media without FBS during indicated time of infection. For TGF-β1 treatment, the A549 cells were stimulated with 5 ng/mL of recombinant human TGF-β1 (Peprotech) during 1 h at 37 °C. The treatment was stopped by washing with phosphate buffer saline (PBS) solution and changing by fresh medium without FBS.

A549 cells were infected with the virus at a multiplicity of infection (MOI) of 5 or 10, according to experiment. After 1 h of incubation, the inoculum was removed and cells were washed twice with PBS and supplemented with growth media without FBS and 2 ng/mL with TPCK trypsin.

The pre-incubation treatment with TGF-β1 consisted in stimulating with 2 or 5 ng/mL of recombinant human TGF-β1 (Peprotech), according to experiment, during 1 h at 37 °C. Following, the inoculum was removed and cells were washed twice with PBS and the cells were IAV infected at the same conditions before mentioned.

At different times post-infection, supernatants were removed for cytokine evaluation and stocked at −20 °C, until their analysis. Whereas, cells were washed with PBS buffer and lysed to microarray and electrophoretic analyses.

2.3. Western blot assays

The protein fraction of A549 cells were extracted by using the lysis buffer [25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycolate, 1% IgePal, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 8.0, complemented with proteases (Roche) and phosphatases inhibitors cocktail (Roche)], on ice for a minimum of 30 min. Supernatants were cleared by centrifugation in a standard tabletop centrifuge (Labnet) at maximum speed (13,000 rpm) for 15 min. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio Rad) and 25 μg of protein was loaded per lane into reduced SDS-PAGE gels of different percentage. After separation, proteins were transferred to nitrocellulose membrane for western blotting. Nitrocellulose membranes were blocked with 1% BSA or 5% of fat-free dry milk by 2 h at room temperature and probed for SMAD7 (goat IgG N-19 clone, Santa Cruz Biotech.), SMAD2/3 (goat IgG N-19 clone, Santa Cruz Biotech.), phospho-SMAD 2/3 (rabbit IgG Ser 423/425, Santa Cruz Biotech.), M1 virus protein (mouse HB-64, ATCC), caspase-1 (rabbit IgG 178280, Abcam), TβRI (rabbit IgG RM0016−3A11 clone, Santa Cruz Biotech.), TβRII (mouse IgG C-4 clone, Santa Cruz Biotech.) and β-actin (goat IgG C-4 clone, Santa Cruz Biotech.); followed by horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Immune complexes were detected by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer) and recorded by ChemiDoc XRS (Bio Rad).

2.4. Antibody array for apoptotic related proteins

In parallel studies, cell extracts of control cells, IAV infected cells and TGF-β1 pre-treated cell followed by IAV infection were analyzed using the Human Apoptosis Array kit (R&D Systems), with the aim of evaluate the relative abundance of 35 apoptosis-related proteins. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio Rad) and 25 μg of protein of cell lysates was loaded per panel of apoptosis array kit analyzing the four distinct conditions already mentioned. Expression was detected by enhanced chemiluminescence and recorded by ChemiDoc XRS (Bio Rad). Relative abundance was determined from pixels by

mm^2 employing Quantity One v.4.5.1 software (Bio Rad), corresponding to each pair of signals dots and comparing to control cells group. An individual comparison and heatmap pattern between apoptosis-related proteins was done using Prism software v.8.0 (GraphPad).

2.5. Analysis of apoptosis induction by YO-PRO/propidium iodide

The percentage of apoptotic cells was assessed by flow cytometry for monitoring cell apoptosis employing the propidium iodide dye (50 μg/mL, ThermoFisher) and the impermeant DNA intercalatant YO-PRO™ (ThermoFisher). Cells samples were analyzed by FACScalibur (Becton Dickinson) and apoptotic cell percentage (PI^+/YO-PRO^+) were evaluated with the software CellQuest v.3. The analysis was performed by triplicated assays.

2.6. Quantification of IL-1β and TGF-β1 by ELISA

The supernatants were fixed on high binding 96 well plates using sodium bicarbonate solution (1 mM) overnight in a 1:1 dilution at 4 °C. After fixation 96-well plates were maintain at room temperature before wash with PBS solution, followed by blocking with 5% of fat-free dry milk by 2 h at room temperature and probed for TGF-β1 (Preprotech) and IL-1β (Preprotech) antibodies for 2 h. After washing primary antibody horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) were added and incubation was left to proceed for further 1 h. Plates were analyzed at 405 nm with ABTS solution (Sigma).

2.7. Viral titer assessment

For these particular assays, viral infection in A549 cells, with or without pre-incubation with TGF-β, was performed and incubated for 24

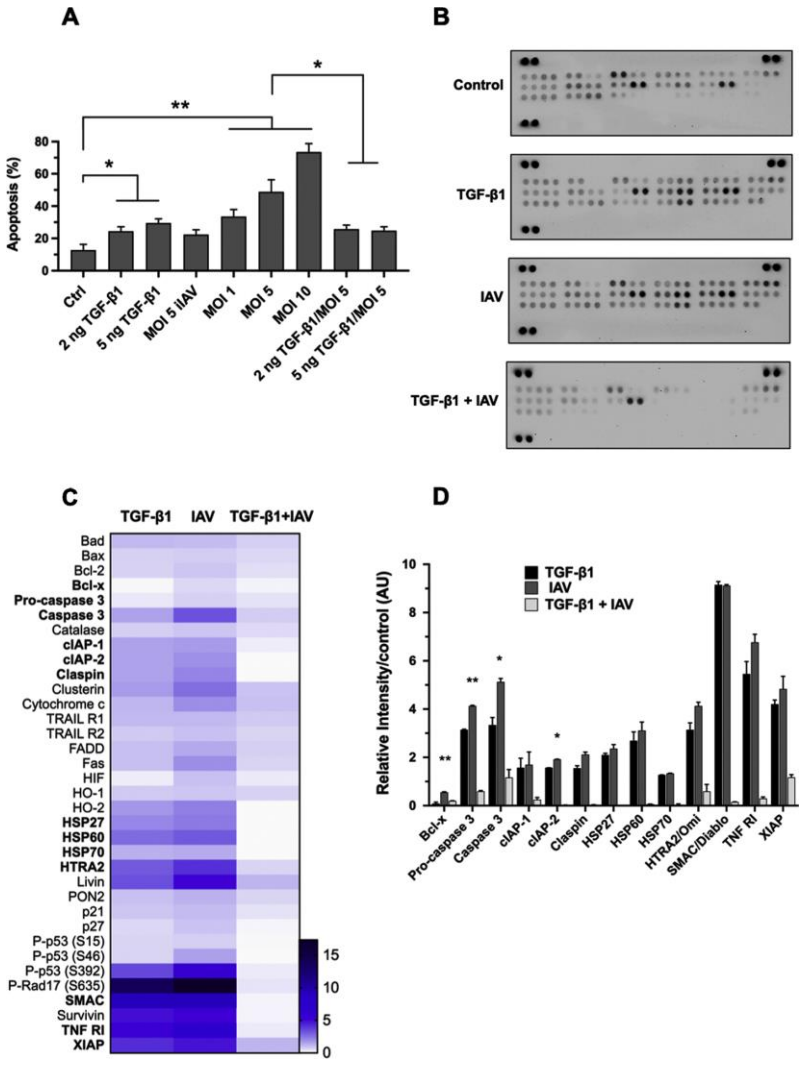


Fig. 1. TGF-β1 pre-treatment inhibits apoptotic effect and expression of apoptosis-related proteins induced by IAV infection in A549 cells. A) Comparative statistical analysis of apoptosis effect of different cell treatments. Columns mark cell percentage means and standard deviation of three independent assays. Statistical comparison between conditions was done employing by Mann-Whitney test, considering a $p < 0.05$. B) Apoptosis-related proteins array comparing 24-hrs incubation period of control cells, TGF-β1 only treated cells, IAV infected cells and TGF-β1 treatment previous to IAV infected cells. C) Graphical heatmap comparison of the relative abundance of apoptosis-related proteins array. Color heatmap summarize comparisons of protein relative abundance between groups is included. Apoptosis-related proteins inhibited by TGF-β1 pre-treatment are marked in bold. D) Graphical comparison of apoptosis-related proteins significantly reduced by TGF-β1 pre-treatment. Asterisks identify proteins that were significantly increased due to the effect of IAV infection, in comparison to TGF-β1 treatment alone.

and 48 h post-infection. Two-fold serial dilutions of the supernatants were incubated with MDCK cells in 96 well plates. After 1 h of incubation, the inoculum was removed and cells were washed twice with PBS and supplemented with growth media without FBS. After 16 h post-infection, the cells were fixed with acetone 80% in PBS and a rabbit anti-IAV polyclonal antibody (home made) added and incubated for one hour at 37 °C. The cells were washed with PBS and incubated for one hour at 37 °C with a goat anti-rabbit IgG antibody coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch). Immune complexes were detected by staining with 3-amine-9-etil carbazol (Sigma Aldrich) in 1 M acetate buffer. The stained cells (focus) were counted and the viral titers reported as focus forming units per mL (ffu/mL).

2.8. Statistical analysis

Descriptive statistics was used, with mean and standard deviation. All experimental tests were carried out in duplicate or triplicate independent assays. The significant differences were determined using the U-Mann Whitney test and considering a value of $p < 0.05$. Prism v.8.0 software (GraphPad Inc.) was used throughout the work.

3. Results

3.1. Pre-incubation with TGF-β1 inhibits cell death of IAV infected cells

It is well known that Influenza virus-induced apoptosis plays a relevant role for its replication and spread. On the other hand, since TGF-β1 plays a powerful anti-inflammatory role, we wanted to know if this incubation, before the *in vitro* viral infection, has any effect on the cell apoptosis. For that, we performed flow cytometry evaluation (YO-PRO/propidium iodide, Fig. 1A) of A549 cells treated with TGF-β1 or IAV infection. As expected, TGF-β1 incubation induced small but significant apoptotic (Fig. 1A) or cytotoxic effect (Supplementary Fig. 1), in comparison with control. In the same way, IAV infection significantly increased cell apoptosis in a dose-dependent fashion from MOI of 1 up to MOI 10. This response was the result of the infection since inactivated IAV equivalent to MOI 5 induced only background levels of apoptosis. Strikingly, 1 -h pre-incubation with TGF-β1 did not synergized but rather abrogated the apoptosis induced by IAV (Fig. 1A). Incubation of TGF-β1 at the same time or 1 h after incubation with the virus, showed similar results to incubation with the virus alone (data not shown).

This preliminary result helped us to propose that the pre-incubation with TGF-β1 could exert an important effect over the cellular response for the IAV infection. As mentioned, IAV could use the activation of the apoptotic pathways as a resource of viral propagation.

With the aim of identifying the apoptotic mechanisms induced by the IAV infection and the effect on them by the TGF-β1 pre-incubation, we repeated our experiments under the four distinct conditions as already mentioned (Supplementary Fig. 2A). After each incubation, cell lysate from each experimental group were analyzed by an antibody array for apoptosis comparing the relative abundance of 35 apoptotic-related proteins. In Fig. 1B, a representative comparison between the treatments is shown. As expected, TGF-β1 by itself induced an increase of some apoptotic-relative proteins, in comparison to control condition. However comparatively, the magnitude and amplitude of the apoptotic effect induced by IAV infection was greater, affecting at least 25 of the 35 proteins studied as showed in heatmap analysis (Fig. 1C).

According to the previous results, pre-incubation with TGF-β1 importantly inhibited the relative abundance of pro-apoptotic proteins induced by IAV infection. The heatmap analysis (Fig. 1C) highlights the great effect of TGF-β1 pre-incubation, since proteins with remarkable abundance in the other treatments practically disappeared. Fig. 1D shows a comparison of the relative abundance of the apoptotic proteins that were significantly diminished by TGF-β1 pre-incubation, in comparison to IAV infection. Likewise, indicated with asterisks, are the proteins that were significantly increased due to the effect of IAV infection, compared to treatment by TGF-β1 alone. Based on these results, we can conclude that the different apoptotic pathways activated by IAV infection seems to be inhibited partially or completely by TGF-β1 pre-treatment.

3.2. TGF-β1 pre-incubation previous to IAV infection inhibits the viral replicative cycle

In order to evaluate whether TGF-β1 pre-incubation also exerts an effect on the viral replicative cycle, we evaluated the relative abundance of M1 viral protein, employing the same experimental conditions. It was found a 30% decrease in the relative abundance of M1 protein in cell lysates with TGF-β1 pre-treatment (Fig. 2A and B), also showing a delay in the viral protein expression (Fig. 2B). When the stimuli of TGF-β1 is applied after the IAV infection, the M1 protein detected by immune assay show a similar effect as IAV alone (Supplementary Fig. 2B). To determine whether the reduction of M1 protein expression in cells pre-treated with TGF-β1 resulted in less infectious viral progeny, cells were pre-treated with TGF-β1, infected with IAV and 24 and 48 h later the supernatants were collected and the virus infectivity tested on MDCK cells in a focus forming assay. It was found, that at 48 h post-infection the pre-treated cells generated only 50% of the infectious virus compared to IAV-infected cells. These results strongly suggest that pre-treatment of TGF-β1 signaling pathways by a still non-identified mechanism regulates the virus replication cycle and inhibits host cell apoptosis induced by IAV.

3.3. TGF-β1 pre-incubation and Smad2/3 activation prevents Smad7 induction

To gain information about the mechanism by which TGF-β1 could exerts its inhibitory effect on the IAV infection and its cellular consequences, we evaluated the temporal changes of the TGF-β1″canonical" signaling pathway from 30 min to 24 h post-infection, in the experimental conditions previously evaluated. TGF-β1 treatment alone on A549 cell line induced a relevant increase of Smad7 levels in a biphasic manner, showing the maximum increasing abundance at 6 h and 14−16 hours post-infection (Fig. 3A and B). Although not clearly observed in these experiments, we observed as expected, an increase of Smad2/3 phosphorylation by incubation with TGF-β1 at short times (Supplementary Fig. 3), keeping the levels of Smad2/3 proteins constant (Fig. 3A).

On the other hand, IAV infection induced an increase of Smad7 levels, showing the maximum abundance between 6−16 hours post-infection (Fig. 3A y B). Probably as consequence of the increase of Smad7 during IAV infection, the Smad2/3 phosphorylation had a limited increase all along the 24-hrs post-infection period, as observed in Fig. 3C.

In contrast, incubation with TGF-β1 previous to IAV infection induced a substantially reduction of Smad7 levels all along the post-infection period evaluated (Fig. 3A and B), which coincided with a substantial increase in Smad2/3 phosphorylation levels during the 2−16 hours post-infection period (Fig. 3A and C). These results suggest that IAV infection induces a significant increase of Smad7, resulting in the inhibition of the signaling pathway itself but in this context, pre-incubation with TGF-β1 to IAV infection caused a greater increase in Smad2/3 phosphorylation levels, which was accompanied by a limited abundance in Smad7 levels. In this way, pre-incubation with TGF-β1 will make its signaling pathway (Smad2/3 phosphorylation) partially refractory to the inhibitory effect induced by IAV infection, making it possible to allow the cytokine to continue to exert its anti-inflammatory effect.

These data were also compared with cell lysates where the treatment with TGF-β1 was performed 1 h after the IAV infection (IAV + TGF-β1). In this case, the activation of the TGF-β1 pathway (Smad2/3 phosphorylation and Smad7 abundance) behaved in the similar way as the

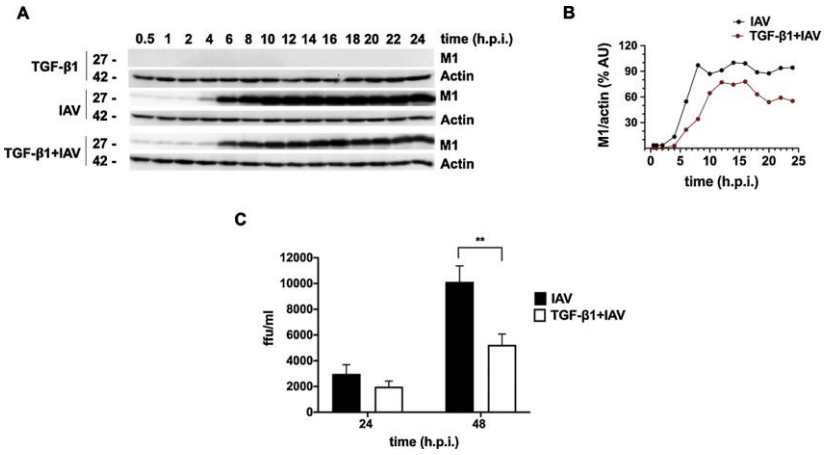


Fig. 2. TGF-β1 pre-treatment inhibits M1 protein expression and viral replication on A549 cell line. A) Effect of TGF-β1 pre-treatment on the relative abundance of the immunodetected IAV M1 protein (25 kDa) along 24-hrs post-infection period in A549 cells. D) Comparison of relative abundance M1 *versus* β-actin in A549 infected cells of two independent assays. C) Effect of TGF-β1 pre-treatment on the viral titer. The cell culture supernatants of the infection assays were collected 24 and 48 h post-infection and evaluated according to the conditions described in Material and Methods. For the comparison between treatments, the Mann-Whitney test was employed, considering a $p < 0.05\%$. Columns mark focus forming units (ffu/mL) means and standard deviation of four independent assays. ** $p < 0.001$.

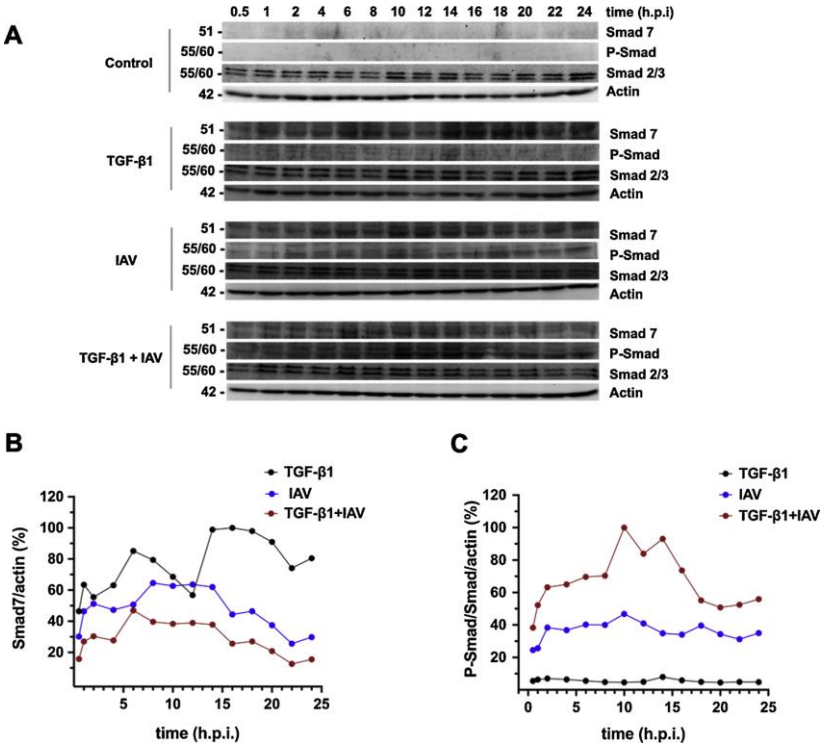


Fig. 3. TGF-β1 pre-treatment favors Smad2/3 phosphorylation and prevents Smad7 induced by IAV infection. A) Effect of IAV infection over the phosphorylation status of Smad2/3 and Smad7 relative expression along 24 h post-infection period in A549 cells. B) Comparison analysis of the relative abundance of Smad7 during IAV infection with or without TGF-β1 pre-treatment. Smad7 status was obtained by normalizing intensity of immunodetected band for Smad7 with intensity of the corresponding β-actin band. C) Comparison analysis of the Smad2/3 phosphorylation status during IAV infection with or without TGF-β1 pre-treatment. Phosphorylation status was obtained normalizing according, first with relative intensity of the corresponding Smad2/3 bands, followed by the corresponding β-actin band intensity. Representative results of two independent assays.

infection alone and the viral protein M1 did not show differences in abundance kinetics, compared to the IAV infection (Supplementary Fig. 2C), showing that the order of TGF-β1 signaling pathway is the critical factor to induce the antiviral and anti-apoptotic effect. Finally, parallel assays of control cells (without infection and without incubation with TGF-β1) showed relatively constant levels of Smad 2/3 and β-actin, but without visual detection of phosphorylated forms of Smads or Smad 7 (Fig. 3A).

3.4. TGF-β1 pre-treatment reduces inflammasome activation, as well as increased TGF-β1 release and TβRI and TβRII induction

According to previous studies showing that IAV infection activates inflammasome signaling as a mechanism to induce an inflammatory response as an immune response, we evaluated whether TGF-β1 pre-treatment was also capable of modifying the caspase-1 activation. Initially, the IAV-infected A549 cell line showed substantial changes in the levels of the active caspase-1 fragment (20 kDa) throughout the 24 h post-infection period (Fig. 4A). Interestingly, abundance of cleaved-

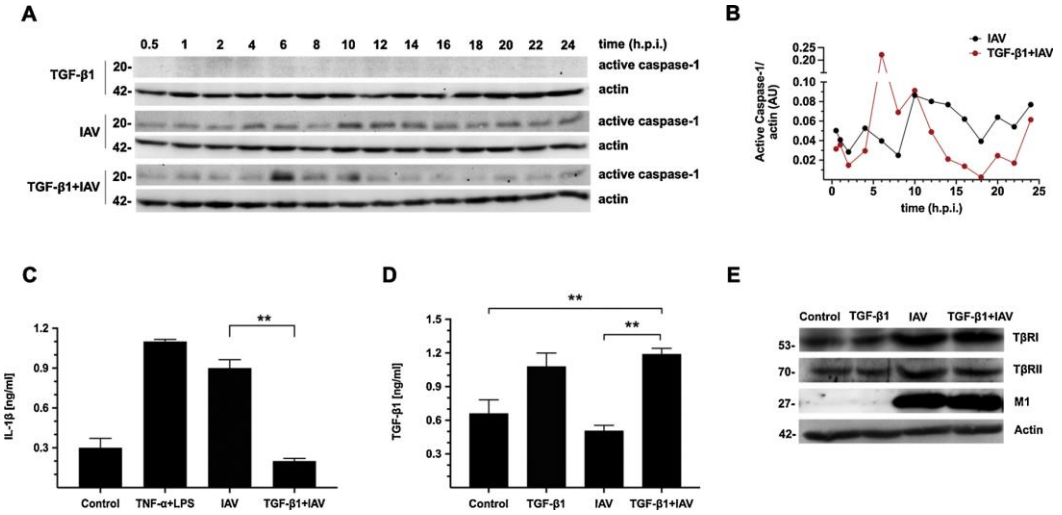


Fig. 4. TGF-β1 pre-treatment reduces inflammasome activation, as well as increased TGF-β1 secretion and its receptors (TβRI and TβRII). A) Comparison of active caspase-1 band between treatments by IVA infected cells and TGF-β1 treatment plus IAV infection. B) Relative abundance of active caspase-1 with the corresponding actin level along the 24-hrs post-infection period. C) Cell culture supernatants IL-1β levels for the four experimental conditions. D) Levels of TGF-β1 released to the culture supernatant under the different treatment. E) Comparative abundance of TGF-β1 receptors (TβRI and TβRII) under the different cell treatment (24 h). Statistical significance was evaluated by Mann–Whitney test, considering a $p < 0.05$, from three independent assays.

caspase-1 induced by IAV infection showed a non-linear pattern during the 24 h post-infection period, showing a maximum between 10 and 16 h post-infection, suggesting a regulatory mechanism (Fig. 4B). According with the increase in caspase-1 activation, IAV infection induced a significant increase in IL-1β levels in the culture supernatant, with respect to control cells (Fig. 4C).

On the other hand, compared to the effect of IAV infection, TGF-β1 pre-treatment induced a reduction in the caspase-1 levels altogether with a modification in the kinetics of activation (Fig. 4A), showing an increase of active caspase-1 at 6 h, to subsequently decrease below the observed levels during IAV infection (Fig. 4B). Corresponding with these results, increased levels of IL-1β observed in the supernatant of infected A549 cells, were significantly inhibited by TGF-β1 pre-treatment ($p < 0.005$, Fig. 4C).

Additionally, the anti-inflammatory effect of TGF-β1 pre-incubation correlates with a significant increase in secretion of active TGF-β1, with respect to control and IAV infected cells and in a similar proportion to TGF-β1 treatment alone (Fig. 4D). In order to evaluate whether this increase in secretion is a consequence of a change in the sensitivity of the intracellular signaling pathway, we compared the relative levels of the TβRI and TβRII receptors during IAV infection alone or TGF-β1 pre-incubation + IAV infection. As showed in Fig. 4E, in comparison to control and cells only with TGF-β1, IAV infected cells and TGF-β1 incubation prior IAV infection showed a substantially increase of the TGF-β1 receptors (TβRI and TβRII). These results were also confirmed in flow cytometry studies performed on MDCK cells (data not shown). These results suggest that IAV infection induces an increase in the of TGF-β1 receptors, possibly allowing greater cellular activation and induction of its anti-inflammasome response, but the pre-incubation increases the secretion of active TGF-β1 that could modulate the cellular response as the reduction of apoptotic cell death and the secretion of IL-1β due the IAV infection.

4. Discussion

Our results suggest that activation of TGF-β1 signaling pathway previous to IAV infection efficiently disturbs several aspects of virus replication and host cell response, including the synthesis of viral proteins, induction of cell apoptosis and pro-inflammatory cytokines produced by A549 cells. Although there are very few previous studies which suggest a significant relationship between TGF-β1 and IAV infection, data from Schultz-Cherry group support our present observations. These authors observed that TGF-β1 could be extracellularly activated by IAV-neuraminidase activity (Schultz-Cherry and Hinshaw, 1996), resulting in delayed and reduced viral titers and reduced mortality of H5N1-infected mice (Carlson et al., 2010). Our results seem to contrast with other studies where anti-inflammatory or regulatory effects by TGF-β1 may be interpreted as a beneficial to virus infection (Abend and Imperiale, 2008; Gibbs et al., 2009; McCann and Imani, 2007; Thomas et al., 2009). However, in these last studies, the TGF-β1 effect mostly implies its role in the lymphocyte T-regulatory function, whereas in the present study, we propose a direct action of TGF-β1 in the airway epithelium cell response to IAV infection *in vitro*. In a recent study, using a bronchial epithelial TGF-β1 knockout system, the appearance timing of TGF-β1 or IFN-β, at the first days of the infection by IAV H3N2, could be critical for the outcome of the disease, where the epithelial derived TGF-β1 was proposed to play pro-viral effect (Denney et al., 2018). However, unlike our *in vitro* experimental model, since the epithelial TGF-β1 secretion and activation occurs several hours after viral infection (>12 h), the intracellular signaling consequences could be very different from our results. In any case, according to the authors of this study, the results emphasize the importance of the expression and activation at the epithelial level of TGF-β1 to modulate the outcome of viral infection.

In a clear contrast, induction of asthma in a murine model, where TGF-β1 is present, showed a beneficial effect for mice also infected with the H1N1 IAV virus (CA04 and PR8 strains). The authors suggest that the effect did not depend on the virus replication cycle, but on the inflammatory profile of the animals, for which they suggest the beneficial high levels of TGF-β1 secreted by immune cells present in lungs of the asthmatic animals (Furuya et al., 2015). Also, they showed an important data using conditional TβRII knockout mice in which the deletion of the allele of this receptor reduced the resistance of asthmatic mice to the IAV infection (Furuya et al., 2015). In support of the beneficial effect of TGF-β1 during IAV virus infection, other studies suggested that the application of the recombinant cytokine (Srivastava et al., 2012) or its

indirect effect, *via* the induction of IL-6 by alveolar macrophages (Woods et al., 2015) or the expression of ADAP in $CD8^+$ T cells (Li et al., 2015), significantly improves the inflammation and limits experimental lung damage. In this regard, our present results emphasize the idea that timing of TGF-β1 release, activation or blocking is important to host's outcome pathology, favoring pulmonary immune response and limiting pro-viral effects.

Proteomic studies have reported a potential interaction between proteins of TGF-β1 signaling pathway and IAV proteins (Konig et al., 2010; Lai et al., 2012; Lietzen et al., 2011). Employing a global iRNA-interference to characterize host proteins interacting with productive IAV replication, the authors propose that receptors I and II for TGF-β1 could interact indirectly with viral proteins as PB2 or M1 (Konig et al., 2010). A similar observation was obtained analyzing the database VirHostNet 2019 to identify direct or indirect (through at least two direct partners of IAV) interaction between virus and host cell proteins. The authors propose that TGF-β1 receptor I could interact with CDC42 and PIK3RI/II which are direct targets of IAV proteins (Lai et al., 2012). In other study employing the human macrophage as cellular model, the TGF-β1 initially localized at a central position of the interactome, suggesting a key role during the inflammatory host cell response induced by IAV infection (Lietzen et al., 2011).

On the other hand, our results suggest that the balance between Smad2/3 phosphorylation and Smad7 levels may be relevant for the development of the host cellular response during the first hours after infection. An increase in Smad7 levels and low levels of Smad2/3 phosphorylation appear to coincide with increased apoptotic response (Figs. 1 and 2). For its part, an early and sustained increase in the phosphorylation of Smad2/3, seems to overlap with the expression of Smad7 and significantly inhibits pro-apoptotic factors. It is well known that Smad7 is an effective TGF-β1 signaling inhibitor (Hayashi et al., 1997; Nakao et al., 1997; Yan et al., 2009), but its induction during viral infection was unknown. In support of our results that Smad7 could be implicated in the cell apoptosis, clinical studies have showed that its overexpression seems to favors apoptosis of human breast and gastric cancer cells (Hong et al., 2007), granulosa cells (Quezada et al., 2012) and A549 cells (Jeon et al., 2012). In a different context, a previous study suggested that increased levels of IL-1β account for Smad7 overexpression in human chondrocytes by a NFκB-dependent mechanism (Bauge et al., 2008). This observation offers a possible explanation to the up-regulation of Smad7, in parallel to the inflammasome activation, in the course of IAV infection, however more experiments should be performed to confirm the relationship between viral infection and overexpression of Smad7. Additionally, although no necessary involving with Smad7 interaction, other studies have observed a direct interaction of the TGF-β1 signaling elements with several viral proteins, for example from hepatitis C virus (Cheng et al., 2004), yellow fever virus (Quaresma et al., 2006) and HIV(Poggi and Zocchi, 2006).

The exacerbated inflammatory response is a frequent characteristic within the clinical portrait of some viral infections, such as IAV (Peiris et al., 2010). Multiple studies have demonstrated that the clinical outcome depends on the degree of inflammatory response of the host against IAV virus, which is characterized by the cytokine storm and the inflammasome activation. In fact, many reports suggest that inflammasome may play a pivotal role for the host defense, but the immunopathology can raise (Sarvestani and McAuley, 2017). According to previous studies (Ichinohe et al., 2009), we show that the inflammasome is activated as an early response of the IAV infection (6–16 h.p.i), resulting in a significant increase of IL-1β supernatant levels. Interestingly, here we show that TGF-β1 pre-incubation not only alters pro-apoptotic factors, but apparently inhibits caspase-1 activation and therefore blocks the generation of IL-1β.

5. Conclusions

The relevance of this work is based on the fact that TGF-β1 can modulated and control the cell response to the IAV infection acting as antiviral factor, reducing pro-apoptotic proteins and anti-inflammatory cytokine when the cells are pre-treated, through the Smad2/3 activation by phosphorylation, and reducing the presence of Smad7. It could be possible that under IAV infection alone, Smad7 not only contributes as an inhibitory protein of the canonical pathway of TGF-β1, it also could interact with other cellular proteins, resulting in the activation of inflammasome and the apoptotic pathways that could be necessary as an immunological response in the infected cell and furthermore for viral propagation. It remains to be seen how activation of the Smad2/3-dependent pathway could be induced under physiological conditions to promote a less pathogenic viral infection, and the research of new therapeutic targets that control the presence of Smad7 in IAV infections.

CRediT authorship contribution statement

Genoveva BustosRivera-Bahena: Investigation, Methodology, Formal analysis, Software, Writing - original draft. **Delia Vanessa López-Guerrero:** Methodology, Formal analysis, Writing - review & editing. **Alicia Helena Márquez-Bandala:** Methodology, Writing - review & editing. **Fernando R. Esquivel-Guadarrama:** Supervision, Writing - review & editing. **Jose-Luis Montiel-Hernández:** Funding acquisition, Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare not have any conflicts or disclosures within this manuscript file.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dra. Celia Alpuche (InDRe) and Dr. Carlos Arias/Dr, Pavel Isa for providing virus H1N1 strains. This work was supported by grants from the Consejo de Ciencia y Tecnología del Distrtito Federal (041-2009), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CB2007SALUD-2007-C01-82772) and PROMEP-SEP/UAEM (2005-07). G.BR.B received a fellowship during the study from Conacyt (32864).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198337.

References

Abend, J.R., Imperiale, M.J., 2008. Transforming growth factor-beta-mediated regulation of BK virus gene expression. Virology 378 (1), 6–12.
Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., Ting, J.P., 2009. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza a virus through recognition of viral RNA. Immunity 30 (4), 556–565.
Batra, J., Tripathi, S., Kumar, A., Katz, J.M., Cox, N.J., Lal, R.B., Sambhara, S., Lal, S.K., 2016. Human heat shock protein 40 (Hsp40/DnaJB1) promotes influenza a virus replication by assisting nuclear import of viral ribonucleoproteins. Sci. Rep. 6, 19063.
Bauge, C., Attia, J., Leclercq, S., Pujol, J.P., Galera, P., Boumediene, K., 2008. Interleukin-1beta up-regulation of Smad7 via NF-kappaB activation in human chondrocytes. Arthritis Rheum. 58 (1), 221–226.
Bernasconi, D., Amici, C., La Frazia, S., Ianaro, A., Santoro, M.G., 2005. The IkappaB kinase is a key factor in triggering influenza a virus-induced inflammatory cytokine production in airway epithelial cells. J. Biol. Chem. 280 (25), 24127–24134.
Betakova, T., Kostrabova, A., Lachova, V., Turianova, L., 2017. Cytokines induced during influenza virus infection. Curr. Pharm. Des. 23 (18), 2616–2622.
Carlson, C.M., Turpin, E.A., Moser, L.A., O'Brien, K.B., Cline, T.D., Jones, J.C., Tumpey, T.M., Katz, J.M., Kelley, L.A., Gauldie, J., Schultz-Cherry, S., 2010. Transforming growth factor-beta: activation by neuraminidase and role in highly pathogenic H5N1 influenza pathogenesis. PLoS Pathog. 6 (10), e1001136.
Chakrabarti, A.K., Vipat, V.C., Mukherjee, S., Singh, R., Pawar, S.D., Mishra, A.C., 2010. Host gene expression profiling in influenza a virus-infected lung epithelial (A549) cells: a comparative analysis between highly pathogenic and modified H5N1 viruses. Virol. J. 7, 219.

Cheng, P.L., Chang, M.H., Chao, C.H., Lee, Y.H., 2004. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. Oncogene 23 (47), 7821–7838.
Coombs, K.M., Berard, A., Xu, W., Krokhin, O., Meng, X., Cortens, J.P., Kobasa, D., Wilkins, J., Brown, E.G., 2010. Quantitative proteomic analyses of influenza virus-infected cultured human lung cells. J. Virol. 84 (20), 10888–10906.
Denney, L., Branchett, W., Gregory, L.G., Oliver, R.A., Lloyd, C.M., 2018. Epithelial-derived TGF-beta1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza a infection. Mucosal Immunol. 11 (2), 523–535.
Dove, B.K., Surtees, R., Bean, T.J., Munday, D., Wise, H.M., Digard, P., Carroll, M.W., Ajuh, P., Barr, J.N., Hiscox, J.A., 2012. a quantitative proteomic analysis of lung epithelial (A549) cells infected with 2009 pandemic influenza a virus using stable isotope labelling with amino acids in cell culture. Proteomics 12 (9), 1431–1436.
Dwivedi, V., Manickam, C., Dhakal, S., Binjawadagi, B., Ouyang, K., Hiremath, J., Khatri, M., Hague, J.G., Lee, C.W., Renukaradhya, G.J., 2016. Adjuvant effects of invariant NKT cell ligand potentiates the innate and adaptive immunity to an inactivated H1N1 swine influenza virus vaccine in pigs. Vet. Microbiol. 186, 157–163.
El-Sayed, I., Bassiouny, K., Nokaly, A., Abdelghani, A.S., Roshdy, W., 2016. influenza a virus and influenza B virus can induce apoptosis via intrinsic or extrinsic pathways and also via NF-kappaB in a time and dose dependent manner. Biochem. Res. Int. 2016, 1738237.
Furuya, Y., Furuya, A.K., Roberts, S., Sanfilippo, A.M., Salmon, S.L., Metzger, D.W., 2015. Prevention of influenza virus-induced immunopathology by TGF-beta produced during allergic asthma. PLoS Pathog. 11 (9), e1005180.
Gibbs, J.D., Ornoff, D.M., Igo, H.A., Zeng, J.Y., Imani, F., 2009. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells. J. Virol. 83 (23), 12424–12431.
Halder, U.C., Bagchi, P., Chattopadhyay, S., Dutta, D., Chawla-Sarkar, M., 2011. Cell death regulation during influenza a virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway. Cell Death Dis. 2, e197.
Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone Jr., M.A., Wrana, J.L., Falb, D., 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell 89 (7), 1165–1173.
Hong, S., Lee, C., Kim, S.J., 2007. Smad7 sensitizes tumor necrosis factor induced apoptosis through the inhibition of antiapoptotic gene expression by suppressing activation of the nuclear factor-kappaB pathway. Cancer Res. 67 (19), 9577–9583.
Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., Flavell, R., Iwasaki, A., 2009. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. J. Exp. Med. 206 (1), 79–87.
Ichinohe, T., Pang, I.K., Iwasaki, A., 2010. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. Nat. Immunol. 11 (5), 404–410.
Indalao, I.L., Sawabuchi, T., Takahashi, E., Kido, H., 2017. IL-1beta is a key cytokine that induces trypsin upregulation in the influenza virus-cytokine-trypsin cycle. Arch. Virol 162 (1), 201–211.
Jaworska, J., Coulombe, F., Downey, J., Tzelepis, F., Shalaby, K., Tattoli, I., Berube, J., Rousseau, S., Martin, J.G., Girardin, S.E., McCullers, J.A., Divangahi, M., 2014. NLRX1 prevents mitochondrial induced apoptosis and enhances macrophage antiviral immunity by interacting with influenza virus PB1-F2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 111 (20), E2110–2119.
Jeon, W.K., Hong, H.Y., Seo, W.C., Lim, K.H., Lee, H.Y., Kim, W.J., Song, S.Y., Kim, B.C., 2012. Smad7 sensitizes A549 lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through heme oxygenase-1 inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 420 (2), 288–292.
Jochems, S.P., Marcon, F., Carniel, B.F., Holloway, M., Mitsi, E., Smith, E., Gritzfeld, J.F., Solorzano, C., Reine, J., Pojar, S., Nikolaou, E., German, E.L., Hyder-Wright, A., Hill, H., Hales, C., de Steenhuijsen Piters, W.A.A., Bogaert, D., Adler, H., Zaidi, S., Connor, V., Gordon, S.B., Rylance, J., Nakaya, H.I., Ferreira, D.M., 2018. Inflammation induced by influenza virus impairs human innate immune control of pneumococcus. Nat. Immunol. 19 (12), 1299–1308.
Konig, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.H., Bhattacharyya, S., Alamares, J. G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., Gao, Q., Andrews, S.E., Bandyopadhyay, S., De Jesus, P., Tu, B.P., Pache, L., Shih, C., Orth, A., Bonamy, G., Miraglia, L., Ideker, T., Garcia-Sastre, A., Young, J.A., Palese, P., Shaw, M.L., Chanda, S.K., 2010. Human host factors required for influenza virus replication. Nature 463 (7282), 813–817.
Kuriakose, T., Kanneganti, T.D., 2017. Regulation and functions of NLRP3 inflammasome during influenza virus infection. Mol. Immunol. 86, 56–64.
Lai, Y.H., Li, Z.C., Chen, L.L., Dai, Z., Zou, X.Y., 2012. Identification of potential host proteins for influenza a virus based on topological and biological characteristics by proteome-wide network approach. J. Proteomics 75 (8), 2500–2513.
Lee, S., Hirohama, M., Noguchi, M., Nagata, K., Kawaguchi, A., 2018. Influenza a virus infection triggers pyroptosis and apoptosis of respiratory epithelial cells through the type I interferon signaling pathway in a mutually exclusive manner. J. Virol. 92 (14).
Li, W., Liu, Y., Mukhtar, M.M., Gong, R., Pan, Y., Rasool, S.T., Gao, Y., Kang, L., Hao, Q., Peng, G., Chen, Y., Chen, X., Wu, J., Zhu, Y., 2008. Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to influenza a virus infection. PLoS One 3 (4), e1985.
Li, W., Yang, F., Liu, Y., Gong, R., Liu, L., Feng, Y., Hu, P., Sun, W., Hao, Q., Kang, L., Wu, J., Zhu, Y., 2009. Negative feedback regulation of IL-32 production by iNOS activation in response to dsRNA or influenza virus infection. Eur. J. Immunol. 39 (4), 1019–1024.
Li, G., Zhang, J., Tong, X., Liu, W., Ye, X., 2011. Heat shock protein 70 inhibits the activity of influenza a virus ribonucleoprotein and blocks the replication of virus in vitro and in vivo. PLoS One 6 (2), e16546.
Li, C., Jiao, S., Wang, G., Gao, Y., Liu, C., He, X., Zhang, C., Xiao, J., Li, W., Zhang, G., Wei, B., Chen, H., Wang, H., 2015. The immune adaptor ADAP regulates reciprocal TGF-beta1-integrin crosstalk to protect from influenza virus infection. PLoS Pathog. 11 (4), e1004824.
Lietzen, N., Ohman, T., Rintahaka, J., Julkunen, I., Aittokallio, T., Matikainen, S., Nyman, T.A., 2011. Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of influenza a virus-infected human primary macrophages. PLoS Pathog. 7 (5), e1001340.
Lowy, R.J., 2003. Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. Int. Rev. Immunol. 22 (5–6), 425–449.
Manzoor, R., Kuroda, K., Yoshida, R., Tsuda, Y., Fujikura, D., Miyamoto, H., Kajihara, M., Kida, H., Takada, A., 2014. Heat shock protein 70 modulates influenza a virus polymerase activity. J. Biol. Chem. 289 (11), 7599–7614.
Matikainen, S., Siren, J., Tissari, J., Veckman, V., Pirhonen, J., Severa, M., Sun, Q., Lin, R., Meri, S., Uze, G., Hiscott, J., Julkunen, I., 2006. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza a virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. J. Virol. 80 (7), 3515–3522.
McCann, K.L., Imani, F., 2007. Transforming growth factor beta enhances respiratory syncytial virus replication and tumor necrosis factor alpha induction in human epithelial cells. J. Virol. 81 (6), 2880–2886.
Mebratu, Y.A., Tipper, J., Chand, H.S., Walton, S., Harrod, K.S., Tesfaigzi, Y., 2016. Bik mediates caspase-dependent cleavage of viral proteins to promote influenza a virus infection. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 54 (5), 664–673.
Mehrbod, P., Ande, S.R., Alizadeh, J., Rahimizadeh, S., Shariati, A., Malek, H., Hashemi, M., Glover, K.K.M., Sher, A.A., Coombs, K.M., Ghavami, S., 2019. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. Virulence 10 (1), 376–413.
Moore, B., Murphy, R.F., Agrawal, D.K., 2008. Interaction of tgf-beta with immune cells in airway disease. Curr. Mol. Med. 8 (5), 427–436.
Mukherjee, S., Vipat, V.C., Mishra, A.C., Pawar, S.D., Chakrabarti, A.K., 2011. Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induces weaker host immune responses in vitro: a possible mechanism of high transmissibility. Virol. J. 8, 140.
Munoz-Fontela, C., Pazos, M., Delgado, I., Murk, W., Mungamuri, S.K., Lee, S.W., Garcia-Sastre, A., Moran, T.M., Aaronson, S.A., 2011. p53 serves as a host antiviral factor that enhances innate and adaptive immune responses to influenza a virus. J. Immunol. 187 (12), 6428–6436.
Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., ten Dijke, P., 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. Nature 389 (6651), 631–635.
Pasricha, G., Mukherjee, S., Chakrabarti, A.K., 2018. Apoptotic and early innate immune responses to PB1-F2 protein of influenza a viruses belonging to different subtypes in human lung epithelial A549 cells. Adv. Virol. 2018, 5057184.
Peiris, J.S., Hui, K.P., Yen, H.L., 2010. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology. Curr. Opin. Immunol. 22 (4), 475–481.
Poggi, A., Zocchi, M.R., 2006. HIV-1 tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B. Clin. Dev. Immunol. 13 (2–4), 369–372.
Quaresma, J.A., Barros, V.L., Pagliari, C., Fernandes, E.R., Guedes, F., Takakura, C.F., Andrade Jr., H.F., Vasconcelos, P.F., Duarte, M.I., 2006. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. Virology 345 (1), 22–30.
Quezada, M., Wang, J., Hoang, V., McGee, E.A., 2012. Smad7 is a transforming growth factor-beta-inducible mediator of apoptosis in granulosa cells. Fertil. Steril. 97 (6), 1452-1459 e1451-1456.
Roberson, E.C., Tully, J.E., Guala, A.S., Reiss, J.N., Godburn, K.E., Pociask, D.A., Alcorn, J.F., Riches, D.W., Dienz, O., Janssen-Heininger, Y.M., Anathy, V., 2012. Influenza induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12-dependent apoptosis, and c-jun N-terminal kinase-mediated transforming growth factor-beta release in lung epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 46 (5), 573–581.
Saito, A., Horie, M., Nagase, T., 2018. TGF-beta signaling in lung health and disease. Int. J. Mol. Sci. 19 (8), 2460.
Sarvestani, S.T., McAuley, J.L., 2017. The role of the NLRP3 inflammasome in regulation of antiviral responses to influenza a virus infection. Antiviral Res. 148, 32–42.
Schultz-Cherry, S., Hinshaw, V.S., 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. J. Virol. 70 (12), 8624–8629.
Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hinshaw, V.S., 2001. Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. J. Virol. 75 (17), 7875–7881.
Schultz-Cherry, S., Koci, M., Thompson, E., Tumpey, T.M., 2003. Examining the cellular pathways involved in influenza virus induced apoptosis. Avian Dis. 47 (3 Suppl), 968–971.
Sheng, J., Chen, W., Zhu, H.J., 2015. The immune suppressive function of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human diseases. Growth Factors 33 (2), 92–101.
Shim, J.M., Kim, J., Tenson, T., Min, J.Y., Kainov, D.E., 2017. Influenza virus infection, interferon response, viral counter-response, and apoptosis. Viruses 9 (8), 223.
Song, B.M., Kang, Y.M., Kim, H.S., Seo, S.H., 2011. Induction of inflammatory cytokines and toll-like receptors in human normal respiratory epithelial cells infected with seasonal H1N1, 2009 pandemic H1N1, seasonal H3N2, and highly pathogenic H5N1 influenza virus. Viral Immunol. 24 (3), 179–187.
Srivastava, V., Khanna, M., Sharma, S., Kumar, B., 2012. Resolution of immune response by recombinant transforming growth factor-beta (rTGF-beta) during influenza a virus infection. Indian J. Med. Res. 136 (4), 641–648.
Stasakova, J., Ferko, B., Kittel, C., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, H., Egorov, A., 2005. Influenza a mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-

1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. J. Gen. Virol. 86 (Pt 1), 185–195.
Takahashi, T., Takaguchi, M., Kawakami, T., Suzuki, T., 2013. Sulfatide regulates caspase-3-independent apoptosis of influenza a virus through viral PB1-F2 protein. PLoS One 8 (4), e61092.
Tate, M.D., Ong, J.D.H., Dowling, J.K., McAuley, J.L., Robertson, A.B., Latz, E., Drummond, G.R., Cooper, M.A., Hertzog, P.J., Mansell, A., 2016. Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza a virus infection via temporal inhibition. Sci. Rep. 6, 27912.
Terrier, O., Diederichs, A., Dubois, J., Cartet, G., Lina, B., Bourdon, J.C., Rosa-Calatrava, M., 2013. Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. FEBS Lett. 587 (18), 2965–2971.
Thomas, B.J., Lindsay, M., Dagher, H., Freezer, N.J., Li, D., Ghildyal, R., Bardin, P.G., 2009. Transforming growth factor-beta enhances rhinovirus infection by diminishing early innate responses. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 41 (3), 339–347.
Turpin, E., Luke, K., Jones, J., Tumpey, T., Konan, K., Schultz-Cherry, S., 2005. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. J. Virol. 79 (14), 8802–8811.
Veckman, V., Osterlund, P., Fagerlund, R., Melen, K., Matikainen, S., Julkunen, I., 2006. TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-a-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells. Virology 345 (1), 96–104.
Vester, D., Rapp, E., Gade, D., Genzel, Y., Reichl, U., 2009. Quantitative analysis of cellular proteome alterations in human influenza a virus-infected mammalian cell lines. Proteomics 9 (12), 3316–3327.
Woods, P.S., Tazi, M.F., Chesarino, N.M., Amer, A.O., Davis, I.C., 2015. TGF-beta-induced IL-6 prevents development of acute lung injury in influenza a virus-infected F508del CFTR-heterozygous mice. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 308 (11), L1136–1144.
Wurzer, W.J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S., Ludwig, S., 2003. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. EMBO J. 22 (11), 2717–2728.
Yan, X., Lin, Z., Chen, F., Zhao, X., Chen, H., Ning, Y., Chen, Y.G., 2009. Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling. J. Biol. Chem. 284 (44), 30097–30104.
Zhang, C., Yang, Y., Zhou, X., Yang, Z., Liu, X., Cao, Z., Song, H., He, Y., Huang, P., 2011. The NS1 protein of influenza a virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: implication for virus-induced apoptosis. Virol. J. 8, 181.
Zhirnov, O.P., Klenk, H.D., 2007. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of akt and p53 signaling. Apoptosis 12 (8), 1419–1432.
Zhirnov, O.P., Ksenofontov, A.L., Kuzmina, S.G., Klenk, H.D., 2002. Interaction of influenza a virus M1 matrix protein with caspases. Biochemistry (Mosc). 67 (5), 534–539.