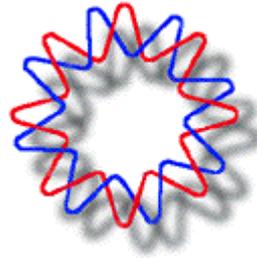




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LA PARTICIPACIÓN
DEL TGF- β EN LA INFECCIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS
MDCK POR EL VIRUS INFLUENZA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

LIC. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA

TUTOR

DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MORELOS

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** que es el motor de mi vida, por todas sus bendiciones, por darme la fuerzas para salir adelante y guiar mis pasos en mi camino, por permitirme disfrutar día a día la alegría de vivir.

A **mis papitos, mi don Beto y mi Tesita** porque son mis mejores maestros de la vida, porque me han enseñado que se necesita mucho coraje y valentía para salir adelante, y que aún en las adversidades una sonrisa y mucho empeño lo cambia todo. Gracias por sus inmenso amor, sus enseñanzas, nuestros paseos y viajes, sus desvelos y sus pláticas interminables, por sus ánimos y su confianza en mí, no seré la mejor hija, pero ustedes son los mejores padres y mi mejor ejemplo, los quiero mucho. Porque aunque te extraño mucho y me haces mucha falta papito, siempre te llevo en mis oraciones, mi mente y mi corazón, porque eres mi ángel y nunca te olvidaré.

A **mis hermanitas Carito y Takita** por aguantarme, por su compañía, su confianza, su apoyo, sus regaños, sus bromas, 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 mí, las quiero muchísimo.

A **mis viejitos doña Fe, Simeón y Petra** porque disfruté mucho vivir a su lado y aprender de la vida, y sé que jamás me han dejado de cuidar donde quiera que estén y porque son los mejores abuelitos, los quiere su flaquita.

A **mi familia y mis niños** (Osvaldo, Rosalba, Nuelany, Gaby, Christopher, Ximena y Breida) por sus ánimos y su confianza en mí, porque han sacado una sonrisa con sus travesuras y he aprendido mucho de ustedes mis latosos.

A **Pedro** porque me has ayudado a no perder la fé en mi misma y a salir adelante a pesar de todo, porque tu compañía, tus pláticas, tus bromas, y tu apoyo incondicional, han sido muy especiales e importantes en mi vida, porque sé que siempre contaré contigo panda.

A **Amed y Poncho** porque su apoyo como amigos ha sido especial, gracias por su cariño.

Al **Dr. José Luis Montiel** por no dudar de mí y permitirme desarrollar este proyecto, sus enseñanzas, por que ha sido un buen jefe y su ayuda y apoyo han sido muy importantes tanto en este proyecto como en mi vida, gracias por su amistad.

A **la Dra Judith González** por sus pláticas, sus enseñanzas, sus consejos, su compañía, por su labor mental diaria de sonreír siempre, sus regaños, por su amistad y apoyo incondicionales.

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.

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

A **mi comité tutorial, Dra. Yvonne Rosenstein y Dr. Ernesto Méndez** por su asesoría y sus comentarios durante la travesía de mi Maestría.

Al **Dr. Gustavo Pedraza y Dr. Luis Terán** por su ayuda y disposición para ayudarme, por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A **la tropa del L-13** por su compañía, sus consejos y sus ánimos, que hicieron del laboratorio mi segundo hogar: Blanca, Karina, Mayelli, Kike, Lili, Juan José (aunque no es del L-13), Javier, Tony (como mi hermana mayor), Oscar, Idalia.

A **mis amigos** Lulú, Irais, Paola, Ivon. Por otro lado están Ivan (Tepoz), Nancy, Gretel, Carlitos (en todas sus variantes), Lucerito, Okocha, Didier, Diana, Xitlali, que aunque son amigos de mis hermanas se han convertido en los míos también, por su apoyo y compañía incondicional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por haberme otorgado la beca con número de registro 207220 para mis estudios de Maestría en Ciencias, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

INDICE

ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Panorama General	1
I.2 Virus influenza	2
I.2.1 Estructura	2
I.2.2 Ciclo replicativo	4
I.2.3 Características clínicas y tratamiento	7
I.3. Respuesta inmune a la infección	8
I.4. Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β)	9
I.4.1 Estructura	10
I.4.2 Receptores del TGF- β	10
I.4.3 Vías de señalización activadas por TGF- β	10
I.4.4 TGF- β y su posible participación en las infecciones virales	11
II. JUSTIFICACIÓN	16
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
IV.1 OBJETIVOS PARTICULARES	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1 Cultivos celulares	21
V.2 Preparación del stock viral y titulación	21
V.3 Protocolo de infección en células MDCK	22
V.4 Determinación de apoptosis por cuantificación de células subhaploides	22
V.5 Determinación del nivel de receptores I y II de TGF- β	23
V.6 Activación de proteínas intracelulares por infección viral y por TGF- β	24
V.7 Análisis por SDS-PAGE/Western blot	24
V.8 Análisis estadístico	25

VI. RESULTADOS	26
VI.1 Obtención y evaluación del stock viral	26
VI.2 Implementación del sistema <i>in vitro</i> de infección viral	27
VI.3 Muerte celular inducida por infección por el virus influenza	28
VI.4 Cambio en los receptores para TGF- β en la infección viral	31
VI.5 Modulación de los niveles de Smad 2/3, pSmad 2/3, P38 y pP38 en células MDCK infectadas	32
VI.6 Efecto de TGF- β sobre la muerte de células MDCK	35
VI.7 Efecto de TGF- β sobre la expresión de sus receptores de superficie	36
VI.8 Modulación de los niveles de activación de p38 en células MDCK debido al tratamiento con TGF- β	38
VI.9 Efecto del tratamiento con TGF- β sobre la infección con el virus influenza	40
VI.10 Cambio en los receptores para TGF- β debido a la estimulación con TGF- β y la infección viral	41
VI.11 Efecto de la incubación con TGF- β en la infección viral sobre la expresión de la proteína NS1	43
VI.12 Modulación de los niveles de activación de Smad 2/3 y P38 debido a la incubación con TGF- β y la infección viral	45
VII. DISCUSIÓN	49
VIII.1 Modelo de infección con virus Influenza <i>in vitro</i>	49
VIII.2 Efecto del TGF- β sobre la infección viral <i>in vitro</i>	51
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BSA	Albumina sérica bovina
CDC	Centro de control de enfermedades
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HA	Hemaglutinina
HAU	Unidades de hemaglutinación
hrs	Horas
IFN- α/β	Interferón tipo 1 α/β
IFN- γ	Interferón γ
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
IP	Yoduro de propidio
kDa	Kilo Daltones
M1, M2	Proteína de Matriz 1, 2
MAPK	cinasa activada por mitógenos
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells, células de riñón de perro
MFI	Intensidad de Fluorescencia Media
MOI	Multiplicidad de infección
NA	Neuranimidasa
NF- κ B	factor nuclear κ B
NO	Óxido Nítrico
NP	Nucleoproteína
NS1, NS2	Proteína viral no estructural 1, 2
PBS	buffer salino de fosfatos
pfu	Unidades formadoras de placa
PI3-K	Fosfatidil-inositol 3 cinasa
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus sincicial respiratorio
SFB	Suero fetal bovino
T β RI	Receptor tipo I del TGF- β
T β RII	Receptor tipo II del TGF- β
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th	Linfocitos T ayudadores
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
who	Organización mundial de la salud

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura del virus influenza.
- Figura 2. Esquema descriptivo de la replicación del virus influenza A.
- Figura 3. Determinación del título viral en células MDCK.
- Figura 4. Cinética de síntesis de la proteína NS1 durante la infección viral.
- Figura 5. Análisis de muerte de células MDCK inducido por infección viral.
- Figura 6. Ensayos de Hemaglutinación.
- Figura 7. Cambio en los receptores para TGF- β I y II (T β RI y T β RII) en la infección viral.
- Figura 8. Modulación de los niveles de Smad 2/3 y su activación por fosforilación (pSmad2/3) durante la infección viral.
- Figura 9. Modulación de los niveles de p38 y su activación por fosforilación (pP38) durante la infección viral.
- Figura 10. Efecto de TGF- β sobre la muerte de células MDCK.
- Figura 11. Efecto de TGF- β sobre la expresión de sus receptores de superficie.
- Figura 12. Modulación de los niveles de p38 y su activación por fosforilación (pP38) debido a la estimulación con TGF- β .
- Figura 13. Análisis de muerte celular debido a la estimulación con TGF- β y/o infección con el virus influenza
- Figura 14. Efecto sobre la expresión de los receptores de superficie T β RI y T β RII debido a la estimulación con TGF- β y la infección viral.
- Figura 15. Síntesis de la proteína NS1 durante la infección viral y la estimulación previa con TGF- β .
- Figura 16. Modulación de los niveles de Smad 2/3 y su activación por fosforilación (pSmad2/3) debido a la incubación con TGF- β y la infección viral.
- Figura 17. Niveles de Smad 2/3 y pSmad 2/3 debido a la estimulación con TGF- β y la infección viral.
- Figura 18. Cinética de modulación de los niveles de p38 y su activación por fosforilación (pP38) debido a la estimulación con TGF- β e infección viral.

RESUMEN

Actualmente la infección por el virus Influenza representa un importante problema de salud, tanto a nivel nacional como mundial. A nivel de las vías aéreas, este virus induce un cuadro inflamatorio muy severo donde el sistema inmunológico puede desempeñar un papel patológico, que en casos extremos puede desencadenar la muerte. En este sentido, el estudio de la inmunopatología asociada a la infección podría ser de gran ayuda para explicar y, eventualmente, diseñar nuevas estrategias terapéuticas para controlar los aspectos más severos de la infección viral. Por otro lado, se acepta que la respuesta inmunológica es crítica para la patogénesis viral, sugiriendo que es posible controlar la respuesta clínica de acuerdo a la modificación de algún elemento inmune regulador. En este sentido, se reconoce que la citocina TGF- β es un importante elemento de regulación de la respuesta inmune, ya que puede estimular tanto efectos anti-inflamatorios como pro-inflamatorios, dependiendo del microambiente celular. Sin embargo, se desconoce su posible participación durante la infección por el virus influenza.

Teniendo como el objetivo el iniciar la caracterización de los efectos celulares e inmunológicos inducidos por el TGF- β durante la infección con el virus influenza, en el presente proyecto se estandarizaron las condiciones *in vitro* para la infección viral en la línea celular MDCK. Se evaluó la posible participación de TGF- β en 3 eventos de la infección viral: inducción de muerte celular, sobre-expresión de receptores para TGF- β y activación de vías de señalización intracelular.

Inicialmente observamos que las células MDCK pre-activadas por el tratamiento con TGF- β e infectadas mostraron un nivel mayor de NS1 en comparación con células no pre-tratadas con la citocina, sugiriendo que el TGF- β podría participar en el ciclo replicativo del virus. Así mismo, el tratamiento con TGF- β indujo un aumento significativo en la muerte celular ocasionada por la infección viral. Por otro lado, la infección viral parece inducir un aumento en el porcentaje de células positivas para los receptores I y II del TGF- β , sin embargo, la presencia de TGF- β , ocasiona un aumento en el porcentaje de células T β RI+/T β RII+ pero estas células presentan un menor nivel de moléculas en su superficie. Estos resultados aparentemente paradójicos, podrían encontrar explicación en la regulación por endocitosis mediada por el ligando. Sin embargo, en nuestros estudios, la infección viral podría controlar la presencia de estos receptores en la membrana celular.

Estos resultados podrían sugerir que en nuestras condiciones de infección de las células MDCK por el virus influenza se podría inducir una ligera expresión o activación del TGF- β , sin embargo los niveles de la citocina en el sobrenadante de cultivo no fueron detectables por ELISA. Finalmente, evaluamos la posible participación de las vías de señalización activadas por el TGF- β en la infección viral: Smad 2/3 y p38. Nuestros resultados sugieren que activación Smad 2/3 correlaciona con la infección viral, mientras que la modificación por fosforilación de p38 en células infectas (incremento a las 24 hrs) disminuye por el pre-tratamiento con TGF- β . Estos datos en su conjunto sugieren que el TGF- β puede estimular al menos dos eventos característicos de la infección por el virus Influenza en células MDCK: síntesis de NS1 e inducción de muerte celular, donde la vía de las Smads parece tener una participación.

ABSTRACT

The Influenza virus infection represents a relevant national and world health problem in our days. At the human respiratory tree, a severe inflammatory response is induced by the viral infection where the immune system could have a pathological role that in some cases could be fatal. For that, the study of the immunopathology associated with the Influenza infection could be of great help to explain and eventually, to design new therapeutic strategies to control the more severe consequences of the viral infection. By other side, it is generally accepted that regulation of the immune response is critical in the viral pathogenesis, suggesting that it should be possible to control the clinical symptoms according to which regulatory factor is modified. In this sense, the cytokine TGF- β is recognized as an important regulatory element of the immune response, showing anti-inflammatory as well as pro-inflammatory effect depending of the cellular microenvironment. However is practically unknown its potential role as regulatory element during the Influenza infection.

Having as final goal the characterization of the cellular and immunological effects induced by TGF- β during the Influenza virus infection, in the present study we optimized the *in vitro* conditions for the infection in the MDCK cell line. We evaluate its possible participation in three events of the virus infection: cell death induction, overexpression of TGF- β receptors and activation of intracellular signaling events.

Initially we observed that MDCK pre-activated by TGF- β treatment and infected, showed a major level of NS1 in comparison with cells not treated with the cytokine, suggesting a possible role of TGF- β in the replicative virus cell cycle. Additionally, the TGF- β pre-treatment induced a significant increase in the cell death induced by the virus infection. Although the virus infection seems to induce an increase in the TGF- β receptors I and II the MDCK cell membrane, TGF- β shows a major increase of these proteins in the cell membrane, but a minor level of molecules in their surface. These seemingly paradoxical results might find explanation in the regulation mediated by the ligand endocitosis. However, viral infection could monitor the presence of these receptors on the cell membrane.

This data could suggest that MDCK infection by the Influenza virus could induce a minor expression or activation of TGF- β in our *in vitro* conditions; however the cell culture levels were undetectable by ELISA. Finally, we evaluated the possible contribution of the signaling pathways activated by TGF- β during the virus infection: Smad 2/3 and p38. Our results suggested that Smad 2/3 pathway activation correlates with the viral infection, whereas the specific p38 phosphorylation of infected cells (24 hrs peak) diminished by the pre-treatment with TGF- β . The ensemble of our results suggest that TGF- β stimulate at least two events characterized of the Influenza infection of MDCK cells: NS1 synthesis and cell death, where Smads activation pathway could be involved.

I. INTRODUCCIÓN

I.1.PANORAMA GENERAL

Los virus son los principales responsables de enfermedades respiratorias agudas, al replicarse en las superficies epiteliales tanto en las vías áreas superiores como en las inferiores, lo que constituye la causa de infecciones sintomáticas, con tasas importantes de morbilidad y mortalidad. Entre los agentes causales responsables de estas enfermedades se encuentra el virus de influenza.

La influenza es una enfermedad aguda altamente contagiosa de las vías respiratorias, de morbilidad elevada y capaz de provocar complicaciones potencialmente letales en pacientes de riesgo, como es la población infantil o adultos mayores, por esta razón, esta enfermedad constituye un importante problema de salud a nivel mundial. Se ha reportado que entre el 10 y el 20 % de la población mundial, se infecta anualmente con este patógeno, de los cuales entre 3 y 5 millones presentan enfermedad severa y entre 250 y 500 mil fallecen [1]. Sin embargo, cada cierto tiempo surgen pandemias de influenza que producen un número mucho mayor de muertes.

La influenza, es una enfermedad infecciosa causada por alguno de los tres géneros de la familia *Orthomyxoviridae*: A, B y C. Los géneros B y C infectan a los humanos y su sintomatología es poco severa. Sin embargo, el género A, puede infectar a varias especies, entre ellas a las aves y a mamíferos como humanos, cerdos, caballos, ballenas y focas. El genoma del virus de influenza se encuentra particularmente expuesto a mutaciones puntuales y rearreglos, como consecuencia de la ausencia de una actividad de corrección de la replicación, lo que contribuye a la generación de nuevas variantes [2, 3].

Por otro lado, se han reportado diversas epidemias a lo largo de la historia provocadas por este virus. En el siglo XV se le dio el nombre de "influenza" debido a la creencia de que las estrellas influían sobre el origen de las epidemias. En el siglo XX se reportaron tres pandemias provocadas por el virus de influenza A: en 1918 ó "influenza española", en 1957 o "influenza asiática" y en 1968 ó "influenza Hong Kong". Actualmente, existe el peligro latente de la aparición de una nueva pandemia de origen asiático provocada por una cepa de influenza aviar y, aunque se dispone de vacunas y fármacos antivirales en contra de la infección, estas herramientas no son suficientes y no protegen de una manera óptima, especialmente contra pandemias. De manera interesante, datos recientes del centro de control de enfermedades (Control Disease Center o "CDC" por sus siglas en inglés) en EUA, ha observado cambios muy rápidos en el nivel de resistencia a antivirales: en los brotes de influenza tipo A estacional del 2004 a 2006 se

observó un incremento en la resistencia a los adamantanos, mientras que del 2007-2009, la resistencia a Oseltamivir (Tamiflu) aumentó dramáticamente, de 0.7% a cerca del 90% [4]. Esto habla sobre la necesidad de desarrollar nuevas estrategias anti-virales, debido a que en poco tiempo estos fármacos antivirales, podrían ser claramente ineficientes para el control de la infección. En este sentido, el conocimiento detallado de los mecanismos de infección viral en la célula, así como la participación de los reguladores de la respuesta inmune durante los procesos inflamatorios y de muerte celular serán de gran utilidad durante la búsqueda de tratamientos antivirales más eficientes.

I.2 VIRUS INFLUENZA.

El virus de influenza es un virus de ARN de la familia *Orthomyxoviridae*, que está envuelto por una bicapa lipídica y posee un genoma segmentado de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa. Como se mencionó previamente, existen tres géneros antigénicos básicos, llamados influenza A, B y C, los dos primeros poseen 8 segmentos de ARN, mientras que el último sólo cuenta con 7 segmentos. El género A es el causante principal de la enfermedad en el humano y en animales, y por ello, el más estudiado, cuyo genoma de 8 segmentos de ARN, codifican para 11 proteínas.

I.2.1 Estructura.

Como se mencionó previamente, el virus influenza A se encuentra conformado por 8 segmentos de ARN que codifican para 11 proteínas. En la Figura 1 se observa un diagrama esquemático que muestra las glicoproteínas de superficie del virión, HA y NA, así como los 8 segmentos de ARN asociados a las proteínas NP y los componentes del complejo de polimerasa de ARN dependiente de ARN (PB2, PB1 y PA).

En la membrana se localizan 3 proteínas: la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y la proteína de matriz 2 (M2), que juegan un papel importante en la adhesión y endocitosis en las células infectadas así como en la liberación de la célula de nuevas partículas virales. Por su parte, la proteína M2 juega un papel relevante en la liberación del complejo de ribonucleoproteínas hacia el interior de la célula. Además las proteínas HA y NA, juegan un papel muy importante en los mecanismos de la respuesta inmune. De ahí que en base a la antigenicidad de sus proteínas de superficie, se han clasificado 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). Estas proteínas externas, son los principales blancos de los anticuerpos neutralizantes pero al mismo tiempo, son las moléculas más variables del virus influenza. Así, los subtipos de influenza A se definen serológicamente por estas proteínas; por ejemplo, H3N2 se

refiere al subtipo 3 de HA y 2 de NA. Todos estos subtipos se han encontrado en aves acuáticas, y se cree que virus generados por rearrreglos entre virus de aves, porcinos y humanos ha dado origen los serotipos pandémicos en humanos [5].

Por otro lado, la infección por el virus influenza depende de la interacción de la HA con los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular a lo largo del tracto respiratorio. Se reconoce que la HA de los virus aviares es capaz de unirse y reconocer, principalmente, al ácido siálico mediante una unión $\alpha 2,3$ con un residuo de galactosa (SA $\alpha 2,3$ Gal) en el tracto gastrointestinal; mientras que en el tracto bronquial humano, la HA del virus humano reconoce una unión (SA $\alpha 2,6$ Gal). Sin embargo, en 1997, se observó el primer caso de transmisión directa de aves a humanos durante un brote de gripe aviar en las aves domésticas de Hong Kong. Desde esa fecha se han presentado otros casos de infección de H5N1 en humanos, así como de otras cepas como H7N1, H7N2 y H9N1 [6, 7].

Por otro lado, una tercera proteína asociada a la membrana del virus es la proteína de la matriz 2 (M2), la cual actúa como un canal de iones que permite la liberación de las ribonucleoproteínas en el citoplasma de la célula. Esta proteína se forma gracias al proceso de "splicing" alternativo del segmento de ARN viral que codifica para la proteína M1. La proteína M1 forma una matriz por debajo de la bicapa lipídica que le da soporte y recubre al genoma del virus influenza. Asociadas al genoma se encuentran las proteínas PB1, PB2 y PA, que en conjunto actúan como polimerasas del virus; así como la nucleoproteína (NP). Las proteínas no-estructurales NS1 y NS2 se sintetizan durante la infección y juegan un papel importante en la replicación viral [8-10], siendo NS2 la que se origina por "splicing" alternativo del segmento de ARN que codifica para NS1. Recientemente, se reportó la existencia de la proteína PB1-F2, con una longitud de 87 residuos de aminoácidos y que se genera por un marco de lectura +1 en el gen que codifica para PB1, y aunque se creía que era una proteína accesoria, se evidenció que esta proteína actúa a nivel mitocondrial induciendo apoptosis en monocitos pero no así en fibroblastos y células epiteliales; esto posiblemente como un mecanismo que favorece la propagación y aumento de la carga viral [11-13].

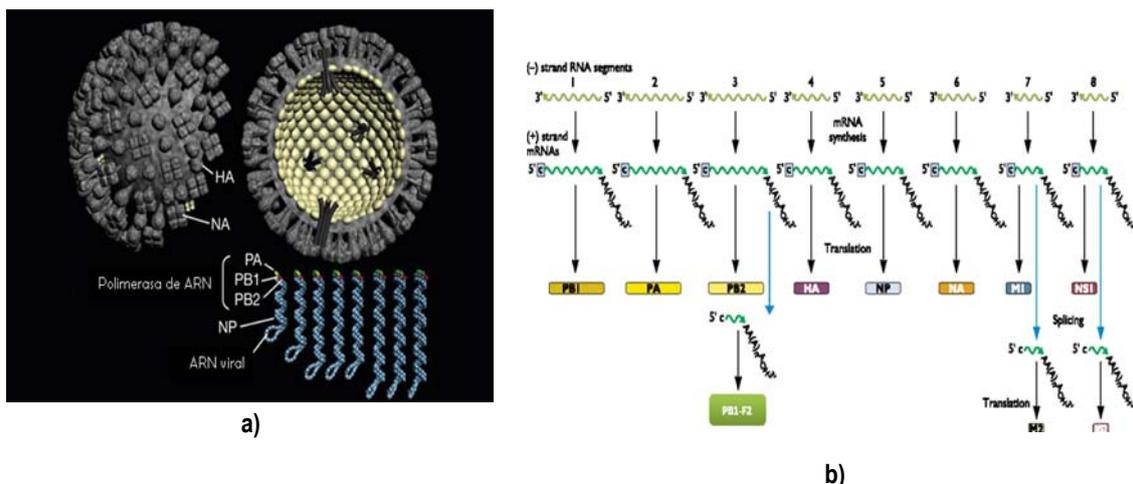


Figura 1. Estructura del virus influenza A. Diagrama explicativo de la estructura del virión influenza A y su genoma. **a)** Se muestra la estructura del virión y las proteínas asociadas al ARN viral. **b)** Se muestran los 8 segmentos de ARN y las 11 proteínas virales generadas a partir de ellos. Tomado y modificado de [14].

I.2.2 Ciclo Replicativo.

El ciclo replicativo del virus influenza es un proceso muy complejo. De forma breve, el virus tiene que reconocer y unirse a su receptor en la membrana celular para poder entrar a la célula, donde se desensambla su genoma y posteriormente, en el núcleo, producir nuevas copias de proteínas virales y ARN mensajeros (ARNm) que darán origen a las nuevas proteínas virales. Finalmente los componentes proteínicos y nucleotídicos se re-ensamblarán para formar las nuevas partículas virales que saldrán de la célula hospedera para continuar replicándose en otras (ver Figura 2)[15].

Como se mencionó previamente, los virus influenza se unen a la célula a través de la proteína HA por medio de los residuos de ácido siálico localizados en la superficie de células epiteliales del tracto respiratorio. Previo a esto, la HA necesita ser cortada proteolíticamente para que el virus pueda entrar por endocitosis [16, 17].

Una vez dentro de la célula, las condiciones ácidas del endosoma, ayudan a que la proteína viral M2, que actúa como un canal iónico, acidifique el interior del virión y que la HA fusione la envoltura viral con la membrana de la vacuola. Todo esto, genera que la partícula vírica se separe, liberando su contenido ribonucleoproteico en el citoplasma de la célula. A continuación, las proteínas y el ARN viral, son transportadas al núcleo celular, donde la el complejo de polimerasa de ARN “dependiente de ARN” conformado por las proteínas PB1, PB2 y PA, en coordinación con la acción de la proteína viral NP, comienzan la transcripción de los

ARN virales complementarios de sentido positivo. Conviene recordar que el genoma del virus de influenza consiste de ARN de polaridad o sentido negativo, por lo que es necesario la generación de una hebra de ARN complementaria para que sea empleada como molde y permita la síntesis de proteínas. Por ello, gracias a la participación de la proteína de exportación viral 2 (NS2) y la proteína M1, los ARNs complementarios son transportados al citoplasma y traducidos en proteínas virales [18]. Las proteínas virales HA y NA pueden ser exportadas tan pronto son sintetizadas a la superficie celular, vía el aparato de Golgi, donde servirán para el ensamble y salida de los nuevos virus. Sin embargo, no todas las proteínas virales participan en la replicación y ensamble del virus, sino que su acción está vinculada en el control de la maquinaria celular, ya sea en la degradación del ARN mensajero celular y/o la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula hospedera, entre otros mecanismos [19]. En este sentido, la proteína viral NS1 es una proteína que muestra acción antagonista al interferón, bloqueando la activación de factores de transcripción y productos génicos estimulados por los interferones de tipo I ((IFN- α/β) [20]. Además NS1 parece inhibir la activación de la RNasa L, la cual participa en la degradación de complejos de ARN de doble cadena como un mecanismo de defensa celular [21, 22]. Algunos estudios han asociado las variaciones de secuencia en la proteína NS1, con la producción de citocinas pro-inflamatorias, lo cual sugiere una relación con la respuesta inmune exacerbada en respuesta a la infección viral por influenza [23].

Una vez que el virus se ha replicado, los ARN de polaridad negativa, las polimerasas y las otras proteínas virales se ensamblan formando los viriones, los cuales salen de la célula mediante gemación. Sin embargo, para poder facilitar que los nuevos viriones puedan alejarse de la membrana celular e infectar células vecinas, se requiere la acción de la proteína NA, la cual corta los residuos de ácido siálico de la superficie celular e impide que la HA de los nuevos viriones pueda unirse con las glicoproteínas de la célula infectada [24, 25].

Cabe resaltar, y como se mencionó previamente, la generación de nuevas cepas virales que puedan ser las causantes de nuevas epidemias y pandemias, se debe principalmente a la nula capacidad de corrección de errores por las polimerasas de ARN virales, ya que pueden cometer errores cada 10^4 nucleótidos. Este alto nivel mutacional es conocido como deriva antigénica (“antigenic drift” en inglés), provocando cambios pequeños y graduales en las proteínas antigénicas del virus [2]. Sin embargo, dado que dos cepas de virus de Influenza, incluso de especies diferentes, pueden coexistir en una misma célula, es posible que ocurran rearrreglos entre los segmentos de ARN. Esto trae como consecuencia la generación de nuevas

cepas virales con características estructurales y antigénicas muy diferentes a la cepa de origen. En varias ocasiones, los virus capaces de infectar a otras especies y vencer la inmunidad protectora del organismo provocando epidemias, resulta de este tipo de modificaciones [26]. Las variaciones antigénicas en HA o NA, disminuyen la capacidad de neutralización de los anticuerpos presentes en los pacientes por resultado de infecciones primarias, posibilitando la susceptibilidad a las infecciones secundarias y disminuyendo la capacidad preventiva de las vacunas [27]; siendo estos mecanismos importantes en la aparición de pandemias como ya se discutió previamente.

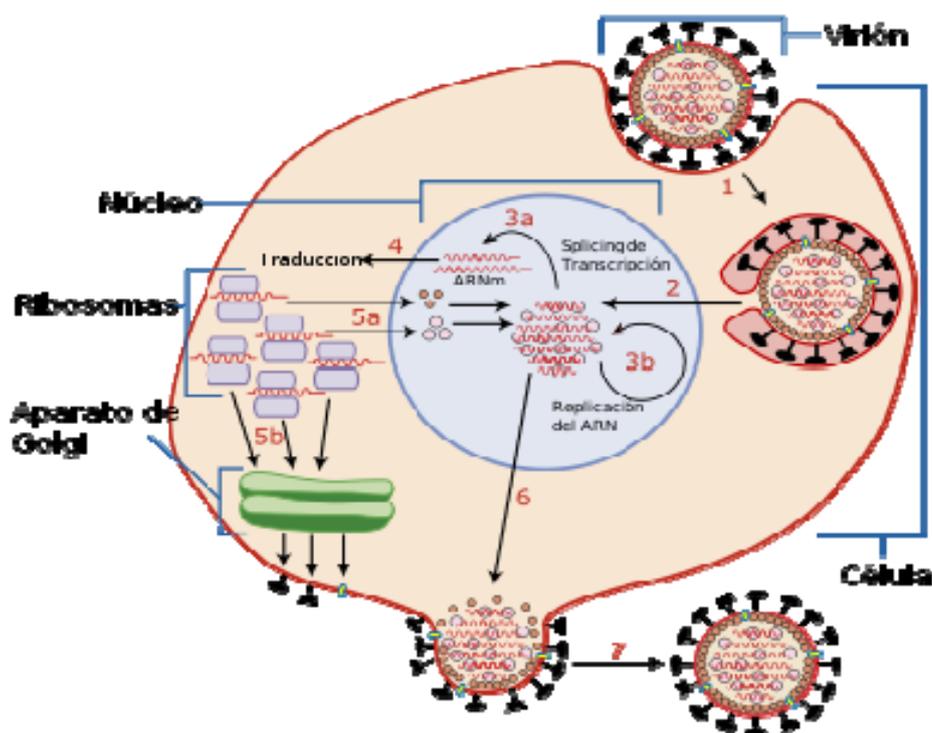


Figura 2. Esquema descriptivo de la replicación del virus influenza A. Un virión se une a la membrana celular del hospedero a través de su proteína HA y entra a la célula mediante el mecanismo de endocitosis mediada por receptor (paso 1). Posterior a esto, la proteína M2, que actúa como un canal iónico, genera que el interior del virión sea más ácido, provocando que la proteína M1 se disocie de la nucleocapsida viral y el complejo de ribonucleoproteínas se transloquen del citoplasma al núcleo a través de la interacción entre la proteína NP y el complejo del poro nuclear (paso 2). Ya en el núcleo, el complejo polimerasa (conformado por PB1, PB2 y PA) se transcribe (paso 3a) y replica los ARN virales (paso 3b). Estos nuevos ARN virales se translocan al citoplasma donde son traducidos a proteínas (paso 4) y las proteínas HA, NA y M2, son sometidas a procesamiento post-traduccional en el aparato de Golgi, y finalmente, transportadas a la membrana celular (paso 5b). Por otro lado, las proteínas NP, M1, NS1 y NEP, son transportadas al núcleo (paso 5a), donde se unen a los ARN virales recién sintetizados, generando nuevos complejos de ribonucleoproteínas que posteriormente migrarán al citoplasma y generando nuevos viriones al interactuar con la proteína M1 y las proteínas de la superficie del virus HA, NA y M2 en la membrana celular (paso 6). Finalmente, los nuevos viriones salen por gemación de la célula infectada, sin embargo para ello, la proteína NA, necesita cortar proteolíticamente los residuos de ácidos siálico que interaccionan con la proteína HA, lo que permite la liberación de la progenie viral (paso 7). Ver texto para mayor detalle.

I.2.3 Características clínicas y Tratamiento.

Debido a la severidad de los síntomas que ocasiona la infección por el virus Influenza, los mecanismos por los cuales el virus causa la enfermedad, han sido estudiados ampliamente. La infección por el virus influenza se caracteriza por síntomas respiratorios (obstrucción nasal, molestias en garganta y tos) y sistémicos (fiebre, escalofríos, mialgia, anorexia, cefalea e insomnio). El genotipo viral es un factor importante en el grado de daño, por ejemplo, los análisis histopatológicos de tejidos pulmonares de individuos que murieron por neumonía de influenza primaria en 1918, mostraron un edema masivo con destrucción de la arquitectura alveolar [28, 29]. Este daño tisular es inducido por la replicación viral y por los procesos inflamatorios asociados [30, 31]. Además, se encontró que la gran cantidad de proteínas producidas por las células hospederas, no sólo se deben a la respuesta inmune, sino también a los niveles masivos de replicación viral producido por ciertas cepas virales de influenza como la H1N1 de 1918 y la influenza aviar H5N1 [32, 33].

Sin embargo los tratamientos son fundamentalmente sintomáticos, pues los fármacos antivirales tienen una eficacia muy limitada y los antibióticos sólo son útiles en casos de infección secundaria cuyo origen sea bacteriano. Además, los virus pueden desarrollar resistencia a las drogas antivirales más empleadas [4, 34-38]. Los fármacos antivirales son especialmente útiles en pacientes de alto riesgo y cuando la epidemia de infección por el virus influenza ya está presente o no hay tiempo para vacunar. Los dos tipos principales de antivirales son los inhibidores de la proteína M2 (derivados del amantano) y de la neuraminidasa. Los antivirales amantadina y rimantadina, han sido diseñados para bloquear un canal iónico (proteína M2) y prevenir así la liberación de los complejos de ribonucleoproteínas virales a las células huésped. Estos fármacos son en ocasiones eficaces frente al virus de influenza. Sin embargo, en la actualidad, los inhibidores de neuraminidasa, son la primera elección en la infección por el virus de la gripe. El oseltamivir (de nombre comercial Tamiflu) y el zanamivir (Relenza) son inhibidores de la neuraminidasa que han sido diseñados para detener la propagación del virus en el organismo humano. Tienen un rango alto de efectividad tanto frente al virus de influenza A como B, ayudando a reducir los síntomas y las complicaciones derivadas de la infección. Sin embargo, datos de la CDC de EUA muestran que la resistencia a Oseltamivir (Tamiflu) por el virus H1N1 estacional aumentó dramáticamente, de 0.7% a cerca del 99% en el término de 2 años. Esto

pone en evidencia la enorme capacidad de variación del virus e indica la necesidad urgente de desarrollar nuevos tratamientos antivirales.

Actualmente, existe el peligro latente de la aparición de una nueva pandemia de origen asiático provocada por una cepa de influenza aviar, o de la aparición de nuevas variantes del virus influenza A, y aunque se dispone de vacunas y fármacos antivirales en contra de la infección, estas herramientas no son suficientes y no protegen de una manera óptima, especialmente en el caso de una pandemia. Esto habla sobre la necesidad de desarrollar nuevas estrategias anti-virales, debido a que en poco tiempo, los antivirales previamente mencionados, podrían ser claramente ineficientes para el control de la infección. En este sentido, creemos que es de gran importancia conocer los mecanismos de infección por el virus influenza, así como la respuesta de la célula ante esta infección viral, dado que este conocimiento, permitiría la búsqueda de nuevos y eficientes tratamientos antivirales.

I.3 RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN.

Las células epiteliales pulmonares son las primeras células infectadas por el virus de influenza A, las cuales a su vez permiten la generación de una gran cantidad de viriones que posteriormente infectan a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares. En el control de la infección por el virus influenza, se ha observado que se requiere de la participación de todos los elementos del sistema inmune, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa [39]. Durante este proceso infeccioso, se ha sugerido que la muerte por apoptosis de los macrófagos y las células epiteliales tiene un papel relevante en la patogénesis debido a su asociación a otros mecanismos, como lo son la inflamación tisular y la inducción de respuestas inmunológicas agresivas, caracterizadas por la alta producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias [40]. Estos eventos juegan un papel importante en la inmunopatología asociada con el virus de influenza, como es el edema masivo pulmonar, las pulmonías primarias y secundarias y las hemorragias pulmonares con bronco-pneumonia aguda [31].

Durante la fase inicial de la infección por el virus de influenza se induce la producción de una gran cantidad de proteínas: citocinas y quimiocinas, las cuales, son los principales factores que facilitan la migración de los monocitos y los linfocitos T al sitio de infección. Las primeras citocinas pro-inflamatorias producidas tras la infección viral son la interleucina-6 (IL-6) y los interferones (IFN) de tipo I, cuyos niveles se correlacionan con la aparición de síntomas clínicos como la producción de moco, fiebre y un aumento de la carga viral [8, 41]. Además, los IFNs son herramientas muy importantes de la célula para inhibir la replicación viral [13, 22, 42, 43]. Como

respuesta a ese control antiviral, el virus de influenza ha desarrollado mecanismos antagonistas, caracterizados por la acción de la proteína no estructural NS1. Estudios en donde se eliminó selectivamente al gen *ns1*, se observó que los niveles de IFN- γ aumentaban considerablemente, y la carga viral se atenuaba [44]. Por otro lado, otras citocinas importantes producidas debido a la infección por el virus influenza, son IL-8 y TNF- α , las cuales se han vinculado en la activación de mecanismos antivirales que eviten la dispersión del virus, el reclutamiento de los neutrófilos y la apoptosis de células infectadas, respectivamente [45, 46].

En resumen, se considera que la severidad de la enfermedad se correlaciona fuertemente con el perfil y los niveles de citocinas producidas por células del sistema inmune y células infectadas [31]. En ese sentido, altos niveles de TNF- α conduce a numerosas anomalías clínicas y patológicas, asociadas con una respuesta inflamatoria aguda en el tracto epitelial respiratorio. Por ejemplo, dos estudios independientes en los cuales se infectaron ratones con el virus de influenza y que se trataron con anticuerpos neutralizantes contra TNF- α , mostraron niveles reducidos de macrófagos y linfocitos infiltrados en sus pulmones, así como una patología menos severa y una mayor sobrevivencia, sin embargo, la capacidad de eliminación del virus fue pobre [47, 48]. Además como se mencionó anteriormente, la gran cantidad de citocinas asociadas a la infección, no sólo se debe a la respuesta inmune, sino también a los niveles masivos de replicación viral producido por ciertas cepas virales de influenza, como se propone sucedió con la infección producida por la cepa H1N1 de 1918 y por la influenza aviar H5N1 [32, 33].

Otra citocina posiblemente relacionada con la inmunopatología asociada con el virus de la influenza, es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Aunque sus niveles de expresión no aumentan como consecuencia de la infección viral, se ha sugerido que la presencia del virus podría inducir su activación a partir de su forma latente ó inactiva, lo cual posibilitaría su participación en la regulación inmunológica y celular [49].

I.4 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β).

El TGF- β es una citocina pleiotrópica, ya que regula una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo: inflamación, quimiotaxis, reparación de tejidos, depósito de la matriz extracelular, tumorigénesis, proliferación, migración y diferenciación celular [50]. En su conjunto, el TGF- β es una citocina regulatoria con diversos efectos sobre las células inmunológicas. Dentro del perfil general de citocinas responsables de la respuesta inmune ante un virus, el TGF- β merece un mención aparte, y es que dentro de la fisiología de las células inmunes, juega un

papel de modulador o inhibidor de múltiples respuestas pro-inflamatorias: inhibición de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, inactivación de células T, inmunoregulación a través de la regulación de la diferenciación de los linfocitos hacia una respuesta tipo Th1/Th17, inducción de apoptosis, aumento de matriz extracelular, inducción de anergia, regulación de la quimiotaxis, activación y sobrevivencia de los linfocitos, las células NK, las células dendríticas, macrófagos, células cebadas y granulocitos [51-55].

I.4.1 Estructura.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un homodímero soluble de 25 kDa, de expresión ubicua [56-59]. Esta citocina se secreta como un factor latente o inactiva, la cual se asocia a la matriz extracelular gracias a la presencia de proteínas de unión permitiendo su acumulación. Aún se ignoran los mecanismos detallados de su activación, pero se propone que pueda ser efecto de la activación de las proteasas extracelulares, como la trombospondina 1 [60], la convertasa de furina [61] o incluso por acción de la NA del virus Influenza [49].

I.4.2 Receptores del TGF- β .

Para que el TGF- β lleve a cabo sus funciones celulares, requiere su interacción con un complejo macromolecular constituido al menos por dos proteínas de membrana con un dominio intracelular de cinasa serina-treonina (Ser-Thr). T β RI o ALK-5 (54 kDa) y T β RII (65 kDa). La unión de la citocina a sus receptores ocasiona la formación de un complejo de receptores, lo cual induce la transfosforilación del sitio (Glicina-Serina) GS en el receptor I y la consecuente activación del dominio cinasa Ser-Thr del receptor I [62]. Estas proteínas están ampliamente presentes en prácticamente todos los tipos celulares, aunque su expresión está fuertemente regulada y su deficiencia conlleva procesos patológicos [63-66].

I.4.3 Vías de señalización activadas por TGF- β .

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 Smad2 y Smad3. Así entonces, posiblemente las proteínas Smad son reclutadas hacia la membrana celular gracias a la participación de la proteína SARA, permitiendo su acercamiento a los receptores membranales. Posterior a la activación del dominio Ser/Thr del receptor I, las

proteínas Smad2 y 3 son capaces de interactuar con el dominio catalítico, lo cual deriva en la fosforilación en el extremo carboxilo terminal de estas proteínas [6, 7]. Esta modificación postraduccional ocasiona un cambio estructural de la proteína Smad fosforilada, permitiendo que interactue con la proteína Co-Smad (Smad4). 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 [67, 68].

Sin embargo, varios estudios han evidenciado que el TGF- β 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, pero cuyos mecanismos de regulación aún se desconocen [67, 69]. Paradójicamente, la sobreexpresión de este factor de crecimiento desencadena otras patologías crónicas, situación que algunos han denominado como el “lado oscuro del TGF- β ” [50, 59].

I.4.4 TGF- β y su posible participación en las infecciones virales.

En afecciones inflamatorias de las vías aéreas, similares a la infección por el virus de influenza, como lo es el asma, en donde se ha encontrado que los niveles de TGF- β , producidos por eosinófilos y células epiteliales bronquiales de individuos asmáticos son altos en comparación con los sujetos normales, lo que sugiere un papel patofisiológico de TGF- β en el asma humana [70, 71]. En este sentido, se considera que el TGF- β inhibe la respuesta hipersensibilidad aguda (AHR) y la obstrucción aérea [72]. Sin embargo, su presencia anormalmente alta y continua, en este proceso inflamatorio, como podría acontecer en la inflamación debido a la infección por influenza, podría inducir una obstrucción de las vías aéreas, como consecuencia de su capacidad fibrolítica o de remodelación tisular. Esta información sugiere que TGF- β no sólo actúa como una citocina anti-inflamatoria, sino que su actividad podría modificarse sensiblemente dependiendo de su concentración, su estabilidad y el microambiente de otros factores celulares y humorales.

Como se mencionó antes, se ha sugerido que durante el proceso patológico inducido por el virus influenza, los niveles de TGF- β activo se elevan posiblemente por efecto de la acción de la glicoproteína NA [49]. La presencia incrementada de TGF- β activo se ha propuesto que participa en la inducción de apoptosis de células linfoides, lo cual explicaría la linfopenia producida en infecciones agudas por influenza [55, 73]. Sin embargo, el papel de TGF- β en la

infección por el virus de influenza no se conoce con exactitud, aún cuando los niveles de esta citocina activa son elevados en patologías respiratorias similares a la infección por influenza.

El efecto pro-apoptótico del TGF- β ha sido ampliamente caracterizado, sin embargo, los mecanismos parecen variar según el modelo celular en estudio [74-78]. Por otra parte, múltiples reportes proponen que la apoptosis inducida por la infección del virus influenza es un evento relevante en la patogénesis [79, 80], aunque aún existe gran controversia sobre sus implicaciones. Así, ante la llegada de este virus, todas las células alveolares (epiteliales y macrófagos) e inmunes que se acercan al sitio de infección (neutrófilos, linfocitos, etc.) son blanco de apoptosis [45, 81]. Para este efecto se ha propuesto la participación de las proteínas NS1 [82], Hemaglutinina [83], Neuraminidasa [84, 85] y PB1-F2 [11], en la activación tanto de las vías extrínsecas (activación de PKR e inducción de Fas) e intrínsecas (dependiente de mitocondria) de la inducción de apoptosis [40]. Por el otro lado, se ha sugerido que el TGF- β puede ser un inductor apoptótico directamente activado por el virus [49] y que podría jugar un papel importante durante esta patología. En congruencia con esta idea, el empleo de anticuerpos anti-TGF- β , demostró que era capaz de bloquear la apoptosis inducida por NA y NS1 [85].

Por otro lado, en la infección por influenza se ha demostrado que las células T citotóxicas (Tc) juegan un papel importante en la protección. De hecho una característica importante de las células Tc en esta infección, y en otras infecciones virales, es su capacidad de reconocer epítopos altamente conservados entre las diferentes cepas virales y, en especial, de las proteínas internas del virus que justamente son las más conservadas [86]. Los mecanismos a través de los cuales las células Tc pueden inducir sus efectos protectores en la infección por influenza son: 1) destrucción de las células infectadas, mediante mecanismos de citotoxicidad y/o inducción de la apoptosis [87]; 2) inhibición directa de la replicación viral a través de la acción de interferones de tipo I, así como otros factores antivirales [88] y 3) reclutamiento y potenciación de la respuesta inmune por células NK y macrófagos [86].

De manera paradójica, varios estudios sugieren que un factor fundamental para explicar los efectos clínicos severos inducidos por la infección de virus influenza en humanos, es consecuencia de la respuesta inmune asociada a esta infección. Así se reportó que la estimulación de linfocitos T CD8⁺ humanos por células dendríticas (DCs) transfectadas que expresan la proteína HA de tipo 5, inducen la inhibición de la producción de la proteína perforina y, por lo tanto, una disminución de la actividad citolítica de los linfocitos T CD8⁺. Adicionalmente, esta estimulación ocasionó un incremento en la producción de INF- γ , lo cual sugiere que la producción prolongada de esta citocina resultaría en un perfil inflamatorio con daño epitelial mayor [89].

Por otra parte, el TGF- β además de inducir efectos inmunomoduladores en el tracto pulmonar, puede estimular la proliferación celular, la inducción de la secreción de moco y un incremento en la migración celular [90-92]. Adicionalmente, en pacientes asmáticos, su expresión aumenta y se correlaciona con el fenotipo y la severidad de la enfermedad del asma, posiblemente debido a su carácter como regulador de la fibrosis pulmonar y remodelación tisular a través de la diferenciación y activación de los fibroblastos [50, 91]. En el mismo sentido, en un estudio con células epiteliales humanas *in vitro*, se observó que el tratamiento con TGF- β inducía un incremento en la replicación del virus respiratorio sincisial (RSV por sus siglas en inglés "Respiratory Syncytial Virus"), al tiempo que ocasionó un aumento en la producción de TNF- α [93]. Estos datos permitirían sugerir que la respuesta exagerada observada durante una infección viral respiratoria, podría desencadenarse por un incremento de TGF- β activo [49]. Sin embargo, aún no se conocen con detalle los mecanismos intracelulares por los cuales TGF- β podría actuar y las vías de señalización que son activadas por esta última citocina.

Por otro lado, Lee y colaboradores [94], observaron que la sobreproducción de TNF- α debido a la infección por el virus H5N1, se encuentra regulada por la proteína p38, que pertenece a la familia de las MAP cinasas (MAPK) y que regula procesos inflamatorios. Estos datos concuerdan con los datos reportados por McCann [93], los cuales muestran que el aumento en la producción de TNF- α , se debe a la activación de la cascada de señalización iniciada por TGF- β en la infección por RSV. Esta hipótesis se apoya en la identificación reciente de MAPK p38 como parte de la vía de transducción de señales independiente de Smads activada por TGF- β [95] y su participación en diversas patologías como el cáncer. En este sentido, conviene considerar que p38, no es el único intermediario de señalización del TGF- β de la familia de las MAPKs, también es posible activar las moléculas ERK 1 / 2 y JNK [96]; y su activación se ha observado en el contexto de la infección por el virus de influenza. En el contexto particular de la infección de influenza del subtipo H5N1, se ha sugerido que su activación está vinculada a un mecanismo viral para permitir su propagación y la exportación de sus proteínas, así como para la inducción de muerte celular por estrés debido a la infección por el virus, respectivamente [97, 98].

Por otro lado, los macrófagos pueden tener efectos diferentes en base a las condiciones de infección viral. Pueden ser benéficos para controlar la infección inicial, pero en casos de una respuesta inflamatoria exacerbada, sus efectos pueden ser dañinos. Así entonces, cuando se inhibe la capacidad fagocítica de los macrófagos en ratones infectados con influenza, se genera una respuesta inflamatoria mayor, asociada a una concentración elevada de neutrófilos y linfocitos en pulmón, lo que se traduce en un daño pulmonar grave [23]; sugiriendo que la

fagocitosis tiene un papel relevante en el control de la respuesta inflamatoria. Aparte de montar una respuesta pro-inflamatoria, los macrófagos también contribuyen directamente en la inmunopatología de muchas enfermedades, debido a que producen y liberan una gran cantidad de especies reactivas del oxígeno (EROs), como lo son el óxido nítrico (NO), nitrito (NO₂), radicales superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), entre otras; como un mecanismo antimicrobiano en contra de una gran variedad de patógenos. Sin embargo, en una situación no controlada, estas moléculas pueden generar un gran daño tisular durante el estrés oxidativo, por lo que se considera juegan un papel importante en la patogénesis asociada a la infección por influenza [99].

En este sentido, Xiao y colaboradores [100] mostraron que el estrés oxidativo bloquea la actividad anti-inflamatoria de TGF- β , por medio de la activación de p38 y el bloqueo de la vía ERK 1/2. En paralelo, también mostraron que la fosforilación y activación de Smad-2, es independiente del estrés oxidativo, sugiriendo que las vías intracelulares de señalización activadas por el TGF- β pueden mostrar, en ciertas condiciones, redundancia pero, en otras ocasiones, pueden desempeñar funciones independientes.

En su conjunto, esta información sugiere que TGF- β podría jugar un papel importante en la inmunopatología asociada a la infección por el virus de influenza, debido a que regula la respuesta de las células pulmonares por medio de la activación de varias cascadas de señalización centrales para la inducción de muerte celular. Asimismo podría ser importante debido a su potente efecto para controlar la diferenciación celular y la producción de citocinas y quimiocinas, lo cual a su vez permiten el reclutamiento de diversas células del sistema inmune encaminadas en controlar la infección viral.

Por otro lado, varios estudios han mostrado evidencias de que la respuesta inmune humoral juega un papel importante en el control y prevención en la infección por influenza [101]. En la respuesta primaria a la infección viral, tanto los anticuerpos IgA como los IgG parecen estar involucrados en la eliminación del virus. Mientras que en la respuesta secundaria, la presencia de anticuerpos específicos, sobre todo del tipo IgA, es suficiente para prevenir la infección, actuando de manera profiláctica [102-105]. Además de la posible actividad neutralizante y opsonizante de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas externas HA y NA, se ha sugerido que las IgA's podrían bloquear el ensamblaje del virus dentro de la célula epitelial en el proceso de transcitosis, que se encuentra mediado por el receptor de inmunoglobulinas poliméricas, lo cual sería un mecanismo para impedir que los virus sean finalmente vertidos a la luz bronquial [103]. De esta manera, los anticuerpos en pulmón podrían estar induciendo protección contra la infección viral por medio de al menos tres mecanismos diferentes. Por otro lado, la protección

profiláctica por anticuerpos contra una re-infección por influenza es eficiente sólo cuando la infección secundaria se da por la misma cepa que la primaria o por variantes de esta cepa con mutaciones que no afecten demasiado los sitios de reconocimiento de HA y NA. Cuando estos sitios son modificados drásticamente por mutaciones acumuladas o cambios antigénicos totales, la protección de los anticuerpos contra HA y NA no es eficiente; esto es, los virus evaden la protección humoral previamente generada [106]. En este contexto, la citocina TGF- β podría cumplir un papel fisiológico relevante, dado que es un potente inductor del cambio de isotipo para la expresión de inmunoglobulinas del tipo IgA, favoreciendo otro mecanismo de control viral [103].

Finalmente, otras células del sistema inmune que juegan un papel importante en la eliminación de células infectadas por el virus de influenza son los linfocitos T CD4⁺, las cuales son importantes para la proliferación y diferenciación de las células Tc y B, a través de la secreción de citocinas [107, 108]. Así entonces, estudios con clonas Th específicas para influenza, transferidas a ratones infectados con el virus indujeron una reducción de los títulos virales, aunque en un nivel inferior al inducido por clonas Tc. En este estudio también se observó que otras clonas de células Th en lugar de tener efectos protectores, exacerbaban la infección y generaban un aumento en la patología pulmonar [109]. Aunque los factores involucrados en este efecto no fueron dilucidados, parecen coincidir con el hecho de que estas clonas eran capaces de secretar altos niveles de citocinas pro-inflamatorias y con capacidad citotóxica. Recientemente, se descubrió una nueva ruta de diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia un tipo de células T ayudadoras (T helper) Th17, caracterizadas por la producción de la citocina IL-17, la cual inicialmente se vinculó como mecanismo de defensa en contra bacterias extracelulares. Varios estudios recientes han confirmado su participación en la inducción de procesos inflamatorios severos [110, 111], como ocurre en la infección por el virus de influenza.

Bajo este contexto y considerando que el nivel de TGF- β activo puede aumentar durante la infección por influenza, al igual que la citocina pro-inflamatoria IL-6; este microambiente podría ser favorable para inducir la diferenciación de las células Th17, de acuerdo a los estudios tanto *in vitro* como en modelos murinos [112, 113]. Así mismo, este efecto podría ser amplificado por TNF- α e IL-1, citocinas que se producen en los procesos inflamatorios. Además, el exceso de diferenciación de los linfocitos hacia una respuesta del tipo Th17, podría inducir la activación de metaloproteasas, que facilitarían la destrucción de la matriz de colágeno y favorecer el reclutamiento de los neutrófilos, lo cual podría conducir al daño de los tejidos [112, 113].

Finalmente, en el plano fisiológico, el TGF- β parece desempeñar un papel muy importante en la homeostasis de las mucosas, previniendo respuestas inflamatorias

perjudiciales. Al parecer TGF- β 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 [55, 73]. Sin embargo, en el contexto de la infección por el virus de influenza, TGF- β 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.

II. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente la infección por influenza representa un serio problema de salud, tanto a nivel nacional como mundial. Este virus induce un cuadro inflamatorio muy severo que conlleva una inmunopatología asociada, y que en casos extremos puede desencadenar la muerte. De esta manera, es importante estudiar la respuesta inmune de una manera integral para poder diseñar alternativas terapéuticas que combatan la infección, limiten la replicación viral y prevengan la inmunopatología.

Se ha descrito que durante el proceso patológico inducido por el virus influenza, los niveles de TGF- β activo se elevan, posiblemente, por efecto de la acción de la glicoproteína NA [49]. La presencia incrementada de TGF- β podría participar en la inducción de apoptosis de células linfoides, lo cual explicaría la linfopenia producida en infecciones agudas por influenza [40]. Además, la inducción de muerte celular en otro tipo de células, se ha asociado a la generación de daños estructurales en los tejidos bronquiales y a la alta producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que atraen células como los leucocitos, al sitio de infección generando una inflamación exacerbada. Esta respuesta inflamatoria produce directamente un daño en los tejidos bronquiales generando síntomas respiratorios, además de que indirectamente, daña al hospedero al liberarse citocinas pirogénicas que no sólo inducen fiebre, sino muchos síntomas y signos de infección debido a la influenza. Por otra parte, la muerte de células inmunes, como los macrófagos, impactaría sobre la capacidad del sistema inmune para controlar la viremia. Sin embargo, dado que se reconoce que TGF- β presenta un efecto antiinflamatorio, su efecto contrario ha sido evidenciado en varios contextos celulares [73, 113].

Aunque la respuesta inflamatoria inducida por el virus influenza tiene un carácter protector, una alteración en su control tan preciso puede desembocar en procesos patológicos más severos. Dentro de la inmunopatología asociada a la infección por influenza, se sabe poco de la participación de TGF- β , a pesar de reconocerse como un factor importante en la inmunoregulación [50]. La observación de que el TGF- β podría activarse por acción directa de la NA del virus, sugiere que pueda tener un papel importante en el mecanismo de infección y, posiblemente, en las consecuencias patológicas. La presencia de un factor anti-inflamatorio y/o apoptótico en proporciones elevadas podría sugerir una respuesta inmunológica pobre, lo cual facilitaría la infección viral. Por otro lado, considerando que el TGF- β participa en la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia la población Th17, se podría sugerir que el TGF- β podría también participar favoreciendo la inflamación, al inducir células Th17 [112].

Por otro lado, dado que la vía de activación de Smads posee un sistema de regulación de corto plazo, Smad-7, al tiempo de que existen evidencias que sugieren que la activación de las Smads no se modifica por efecto de la infección viral, se podría sugerir que las vías de señalización independientes de Smads (MAPKs) podrían participar de manera importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. Algo semejante fue descrito en la infección por RSV, donde TGF- β induce el aumento en la producción de TNF- α , a través de la activación de la vía de p38 [93]. Ya que se desconoce la potencial participación del TGF- β a nivel celular durante la infección por el virus influenza, los resultados obtenidos durante el presente estudio, aportarán una valiosa información sobre los mecanismos moleculares asociados a la inmunopatología inducida por la infección del virus influenza en modelos *in vitro* y a la participación de TGF- β en esta infección. Esta información contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el control eficiente de la morbilidad por influenza.

III. HIPOTESIS

Debido a que el TGF- β participa en procesos tales como muerte celular y la regulación de la respuesta inmune en mucosas, tanto en respuestas anti-inflamatorias como inflamatorias, proponemos que el TGF- β juega un papel relevante en los eventos de apoptosis y de replicación viral inducidos por el virus influenza A en células MDCK, a través de la activación de las vías de señalización canónica e independientes de Smads.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la participación de TGF- β a nivel molecular y celular en los eventos apoptóticos y de replicación viral inducidos por la infección con el virus de influenza, en células MDCK.

IV.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el sistema de infección en células MDCK por el virus influenza H1N1.
2. Evaluar el efecto de TGF- β en la línea celular MDCK en la inducción de apoptosis, sobre los niveles de sus receptores (T β RI/II) y en activación intracelular (Smads/p38).
3. Evaluar la participación de TGF- β en la muerte celular de células MDCK infectadas con el virus de influenza.
4. Evaluar la participación de TGF- β en la replicación del virus influenza.
5. Evaluar la participación de las vías de señalización dependientes de Smads 2/3 y de p38, inducidas por el TGF- β , durante la infección viral por influenza de células MDCK.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Cultivos celulares.

Se utilizó la línea celular MDCK como modelo de estudio (ATCC CCL-34). Estas células se cultivaron en medio Modified Eagle's (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biomeda), 2% de glutamina y 1% de antibiótico (Invitrogen). Para la criopreservación de las células se añadió 5% de DMSO (MP Biomedicals) al SFB y se mantuvieron en congelación bajo N_2 líquido. El número y la viabilidad de las células se determinó por la técnica de exclusión de azul tripano. Las células se diluyeron utilizando la solución TrypLE Express (GIBCO 12604), previo a su adición se lavaron cuidadosamente las cajas de cultivo con el buffer de fosfatos salino estéril pH 7.4 (PBS, 80.6mM de fosfato sódico, fosfato potásico 19.4mM, 27 mm de KCl y 1.37M NaCl) y se añadió la solución de TrypLE Express directamente a la caja de cultivo y se mantuvieron 10 minutos aproximadamente a 37 °C 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 contaron para los ensayos correspondientes o se diluyeron para su crecimiento y uso posterior.

V.2 Preparación del stock viral y titulación.

Los ensayos de infección se llevaron a cabo utilizando el virus 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 monocapas confluentes de células MDCK en cajas de 6 pozos [114]. De manera resumida, se agregaron diluciones seriales 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 0.6%, antibiótico al 1% y tripsina TPCK (3 μ g/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 formaldehído 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).

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de hemaglutinación que nos permitieron cuantificar las partículas víricas presentes. Brevemente, se preparó una solución de eritrocitos humanos frescos al 1% en PBS. Por otro lado, se preparó una dilución 1:20 del stock viral

añadiendo 100 μ l en los primeros pozos, y se hicieron diluciones seriadas en los pozos siguientes. Finalmente se añadió un volumen de 50 μ l de eritrocitos a cada pozo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y al término de este, se observó el título por hemaglutinación.

V.3 Protocolo de infección en células MDCK.

La evaluación de apoptosis en las células MDCK se llevó a cabo de la siguiente manera: se incubaron aproximadamente 3.5×10^5 células MDCK en medio completo 24 horas previas a la estimulación con TGF- β y/o infección por el virus de influenza H1N1 a 37°C y 5% de CO₂. Posterior a este tiempo, las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS y se estimularon con TGF- β (5 ng/ml) por una hora. Terminado este lapso de tiempo, las células fueron lavadas con PBS y se incubaron con el virus de Influenza a una multiplicidad de infección de 1 (MOI 1) en medio MEM sin SFB por una hora a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente, las células se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con medio MEM sin SFB y tripsina TPCK (3 μ g/ml) a diferentes tiempos post-infección. Posterior a los tiempos de incubación, las células fueron tratadas según la técnica de evaluación: 1) para la evaluación de apoptosis y determinación de receptores para TGF- β , las células fueron recuperadas y lavadas con PBS, y se almacenaron en etanol al 70% ó solución PFA 1%, respectivamente a 4°C; 2) para la evaluación de la expresión de NS1 y de la modificación por fosforilación de las vías de señalización intracelulares, las células se lisaron con buffer de lisis por manejo mecánico (10 mM HEPES pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA y 0.5 % Tritón X-100, complementado con inhibidores de proteasas Complete Mini Roche, e inhibidores de fosfatasa P-5726 y P-2850 (Sigma), una dilución 1:100), y se mantuvieron a 4°C por una hora; finalmente se centrifugaron a 13,000 rpm y se almacenaron a -20°C hasta su uso y análisis por Western blot.

V.4 Determinación de Apoptosis, por cuantificación de células Subdiploides.

Las células a evaluar, previamente estimuladas, se lavaron 3 veces con PBS, y se fijaron con etanol frío al 70% a 4°C toda la noche. Al día siguiente, las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS para eliminar el etanol completamente. Posteriormente, las células fueron incubadas con 1 U/ml RNasa (Sigma-Aldrich Co.) e Ioduro de Propidio (50 μ g/ml, Molecular Probes) en PBS, pH 7.4 durante 30 minutos, en oscuridad y a 4°C. A continuación, las células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo FACScalibur (Becton

Dickinson) con el software CellQuest v.3. Con el fin de confirmar los resultados, se realizaron tres ensayos independientes y por duplicado, donde en cada caso se evaluaron al menos 10,000 eventos por ensayo. Para la evaluación del efecto apoptótico se consideró el porcentaje de células subhaploides observadas en un análisis del contenido de ADN y se determinaron la media y desviación estándar para cada tratamiento.

V.5 Determinación de nivel de receptores I y II de TGF- β (T β RI y T β RII).

Para la determinación comparativa del nivel de receptores presente en la superficie de las células, inicialmente las células MDCK se trataron bajo diferentes condiciones de experimentación. A continuación, las células se fijaron aproximadamente 5×10^5 células con paraformaldehído (PFA) al 1%, al menos toda la noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con 1 ml de FACS juice (PBS 1X, suero fetal de ternera al 2% y 0.1% Na N_3) a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 50 μ l de FACS juice, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con FACS juice de nuevo. En seguida, la pastilla celular se incubó con el anticuerpo primario para el receptor I (T β RI): TGF- β RI (policlonal en conejo IgG 200 μ g/ml, sc-9048, Santa Cruz Biotechnology) y para el TGF- β RII (T β RII) (monoclonal en ratón IgG 200 μ g/ml, sc-17791, Santa Cruz Biotechnology), a una concentración de 10 μ g/ μ l, en un volumen final de 50 μ l con FACS juice. Se incubó por 30 minutos a 4°C.

Al término de la incubación, se lavó nuevamente la pastilla celular con FACS juice y, posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado al fluoróforo FITC (Donkey α -conejo IgG-FITC, 100 μ g/ml, Abcam antibodies) y anti-IgG de ratón acoplado al fluoróforo PE (Donkey α -ratón IgG-PE, 100 μ g/ml, sc-3744, Santa Cruz Biotechnology), a una concentración de 10 μ g/ μ l, en un volumen final de 50 μ l con FACS juice y se incubó por 30 minutos a 4 °C.

Finalmente, se lavaron las células con FACS juice y se fijaron con un volumen de 200 μ l de PFA 1%. La adquisición y análisis de las células positivas para ambos receptores para el TGF- β fue determinado por citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) con el software CellQuest v.3 (Becton Dickinson). Para compensar las fluorescencias de cada fluoróforo, se mantuvieron por separado a células que se incubaron únicamente para un receptor de TGF- β , ya sea para el receptor I ó para el receptor II. Con el fin de confirmar los resultados, se realizaron tres ensayos independientes y por duplicado, donde en cada caso se evaluaron al menos 10,000 eventos por ensayo. Los resultados se expresaron

como el porcentaje de células MDCK sensibles a la acción del TGF- β , debido a que poseían ambos receptores.

V.6 Activación intracelular por infección viral y por TGF- β .

Posterior a los tratamientos, y después de ser lavadas con PBS, se les adicionó buffer de lisis a las células MDCK (como se mencionó en las secciones previamente) en una proporción de 1×10^8 cel/ μ l de buffer y a 4 °C. Las células se lisaron por manejo mecánico con ayuda de una micropipeta por un lapso de 1 minuto y se sonicaron por lapsos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos por 3 veces. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a -20 °C hasta su empleo para determinación de proteína, análisis por electroforesis y Western blot.

V.7 Análisis por SDS-PAGE/Western blot.

El análisis por SDS-PAGE se realizó utilizando el método de Laemmli [115], en geles de poliacrilamida al 12 %, y empleando una cámara Miniprotean 3 Cell (BIO-RAD). Se determinó la concentración de proteína de los lisados celulares por el método de Bradford, empleando albúmina (BSA) (AMRESCO) para la curva patrón y se determinó la cantidad de proteína en ensayos por duplicado.

En base a experimentos preliminares y de acuerdo a trabajo previo del grupo de investigación, se ajustó la cantidad a 30 μ g de proteína total por condición. En este sentido, el volumen correspondiente a 30 μ g 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) y se calentaron por 5 min a 95 °C por 5 minutos 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 0.2 μ M (BIO-RAD), en las condiciones recomendadas por el proveedor. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se incubó por una hora con el buffer de bloqueo (PBS, 0.07% Tween20, 5% w/v leche descremada) ó con una solución de BSA al 1% en PBS/Tween 0.05%. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS/Tween20 (0.05%) y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C, con los diferentes anticuerpo primarios (Santa Cruz Biotechnology): 1) α - actina (sc-1615), 2) NS1 (sc-

17596), 3) Smad 2/3 (sc-6032), 4) p38 (sc-7149), diluidos en la solución de bloqueo. Para la detección de las proteínas fosforiladas Smad2/3 y p38, se incubaron los anticuerpos primarios P-Smad2/3 (Ser 423/425) (Santa cruz Biotechnology sc-11769) y P-p38 (Tyr 182) (Santa Cruz Biotechnology sc-7973 clona D-8) en el buffer IP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%).

Al día siguiente, las membranas se lavaron con la solución PBS/Tween 20 tres veces durante cinco minutos cada uno y a continuación se incubaron por 1 hr con el anticuerpo secundario correspondiente: a) anti-ratón (Santa cruz Biotechnology sc-2005), b) anti-conejo (abcam, ab 7083), c) anti-cabra (Santa cruz Biotechnology sc-2354), todos los anticuerpos secundarios acoplados a la proteína peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, después de los lavados con PBS/Tween 20 tres veces, las membranas se incubaron por 1 min con reactivo Western lightning chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y la imagen de quimioluminiscencia fue obtenida en una cámara ChemiDoc XRS (BIORAD). Los análisis densitométricos fueron realizados con el software Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad), empleando la misma área en mm² para la comparación de pixeles. En todos los casos, se evaluaron 2-3 ensayos independientes, y los resultados se presentaron como el promedio \pm desviación estándar.

V.8 Análisis estadístico.

La mayor parte de los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado, en los casos correspondientes se muestra la media \pm desviación estándar. La determinación de las diferencias significativas se determinaron empleando la prueba t de Student y considerando un valor de $P < 0.05$. En todo el trabajo se empleó el software PRISMA v3.3 (GraphPad Inc.).

VI. RESULTADOS.

VI.1 Obtención y evaluación de stock viral.

Para la obtención del stock viral de la cepa H1N1, se expandió el virus mediante la infección de células MDCK (como se mencionó previamente en Metodología) en medio MEM libre de suero a las 40 horas post-infección. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante (aproximadamente se obtuvo un stock final de 50 ml) y se centrifugó a 1200 rpm para la eliminación de *debris* celulares. Con este protocolo se obtuvieron dos lotes de stock viral, que se almacenaron en un volumen de 1 ml en tubos eppendorf a -70 °C hasta su empleo. (La cepa viral H1N1 fue donada por el Dr. Pavel Isa del IBT, UNAM).

La determinación del título viral se obtuvo mediante ensayos de formación de placas líticas en células MDCK en confluencia (ver Metodología), lo que también nos permitió confirmar que el virus fuera infectivo. En la Figura 3, se observa un ejemplo de la titulación viral, donde el pozo control muestra ausencia de placas líticas, mientras que en los pozos con virus infectivo se evidencia la presencia de placas líticas. Así mismo, se observa que el número de placas disminuye de acuerdo al nivel de dilución, permitiendo contar las placas líticas entre las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} . El título viral se obtuvo contando el número de placas, considerando cada placa lítica como una unidad formadora de placa (pfu). En este sentido, los dos lotes de virus H1N1 mostraron títulos de 3×10^7 y 5×10^7 pfu/ml, respectivamente.



Figura 3. Determinación del título viral en células MDCK. A cada pozo de cultivo de células MDCK (con 100% de confluencia), se adicionó un volumen de 1 ml de medio MEM con virus, para realizar diluciones seriadas desde -2 hasta -6 del stock del virus de Influenza H1N1. Las flechas indican las placas líticas visibles. Ejemplo representativo de 2 aislamientos independientes.

VI.2 Implementación del sistema *in vitro* de infección viral.

Una vez establecido el protocolo de cuantificación viral en las células MDCK, se evaluaron otras dos cepas virales del tipo H3N2: 1) serotipo PuertoRico, donado por el Dr. Fernando Esquivel (Facultad de Medicina, UAEM) y 2) serotipo HongKong, donado por la Dra. Celia Alpuche (INDre, SSA). Sin embargo, múltiples ensayos no mostraron capacidad para lisar las células MDCK, por lo que nos concentramos con el serotipo H1N1 (New Caledonia/99).

Con el objetivo de confirmar la infección viral, como primera etapa, evaluamos la síntesis de las proteínas no-estructurales del virus. Para esto realizamos ensayos de infección y sus análisis por western blot para evidenciar la aparición de la proteína NS1; para lo cual se empleó el anticuerpo comercial anti-NS1 (Santa Cruz Biotech.).

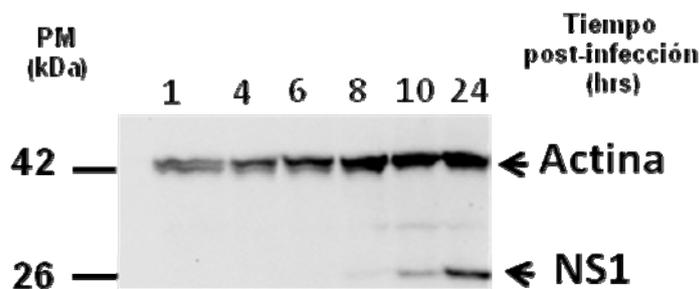


Figura 4. Cinética de síntesis de la proteína NS1 durante la infección viral. Las células MDCK fueron infectadas con una MOI de 1 de virus de influenza H1N1 y se incubaron a diferentes tiempos post-infección. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE/Western blot para la detección de las proteínas actina y NS1. Imagen representativa de tres ensayos independientes de infección viral, por Western blot.

En la Figura 4 se observa una cinética de infección representativa, de tres ensayos independientes, donde se revelaron en la misma membrana de nitrocelulosa las proteínas actina (42 kDa) y NS1 (26 kDa). Como se puede observar, hasta el tiempo de infección de 6 hrs no se aprecia la proteína NS1, sin embargo a las 8 hrs se observa una ligera cantidad de esta proteína. Esta cantidad aumenta significativamente a las 10 y 24 hrs post-infección. Este resultado confirma que los stock virales son capaces de infectar a las células MDCK en nuestras condiciones de ensayo. Sin embargo, como se puede notar en la Figura 4, existen problemas posiblemente con el desarrollo de la técnica, debido al aumento en la intensidad de la banda para la proteína de actina, esto se puede deber a que las células podrían continuar proliferando aún en las condiciones en las cuales se llevaron a cabo los ensayos, en donde se eliminó el SFB

del medio de cultivo. Sin embargo, aún cuando se ajustaron los lisados celulares para contener la misma cantidad de proteína, la cantidad de moléculas de actina reconocidas por el anticuerpo anti-actina mostró un claro incremento. Independientemente de esta situación, los niveles de NS1 parecen aumentar conforme se avanza en el tiempo post-infección, para llegar a un máximo a las 24 hrs, que como se verá a continuación coincide con el efecto de muerte celular y de señalización. Esta información será de relevancia para futuros ensayos ya que permitirá desarrollar estrategias más adecuadas.

En fechas recientes, nos donaron el hibridoma NS1-7 (Dr. F. Esquivel, F. Medicina, UAEM) y pudimos observar que el sobrenadante de cultivo permitió la detección específica de una banda con peso molecular semejante al obtenido con el anticuerpo comercial; esto sugiere que dos clonas de anticuerpos fueron capaces de reconocer la presencia de NS1 en los extractos de células incubadas con nuestro stock del virus H1N1 (dato no mostrado).

VI.3 Muerte celular inducida por la infección del virus influenza.

Otro parámetro que nos permite confirmar la infección del virus de influenza es la inducción de muerte de las células [83, 98, 116]. Con este objetivo en mente, se realizaron ensayos de infección sobre las células MDCK y se evaluó la muerte celular determinando el porcentaje de células subhaploides (ver Metodología). Dado que esta metodología nos permite determinar el contenido de ADN de las células, un aumento en el porcentaje de células con un contenido de ADN menor a las células haploides (G1) podría sugerir que se trata de células con fragmentación de su material genético y, por ende, de células en proceso de muerte celular.

En la Figura 5, se observan histogramas representativos donde se evalúa el contenido de ADN de las células MDCK infectadas con diferentes MOIs por el virus influenza (utilizando la solución stock aislada con un título viral de 5×10^7 pfu). Como se puede observar, las células sin virus presentaron un nivel de 7.4% de células subhaploides, mientras que las células infectadas a diferentes MOI siempre presentaron niveles mayores de células subhaploides, sugiriendo que la infección inducía la fragmentación del ADN y la muerte de las células. Asimismo, es posible observar una relación directamente proporcional entre el número de partículas virales y el nivel de muerte celular.

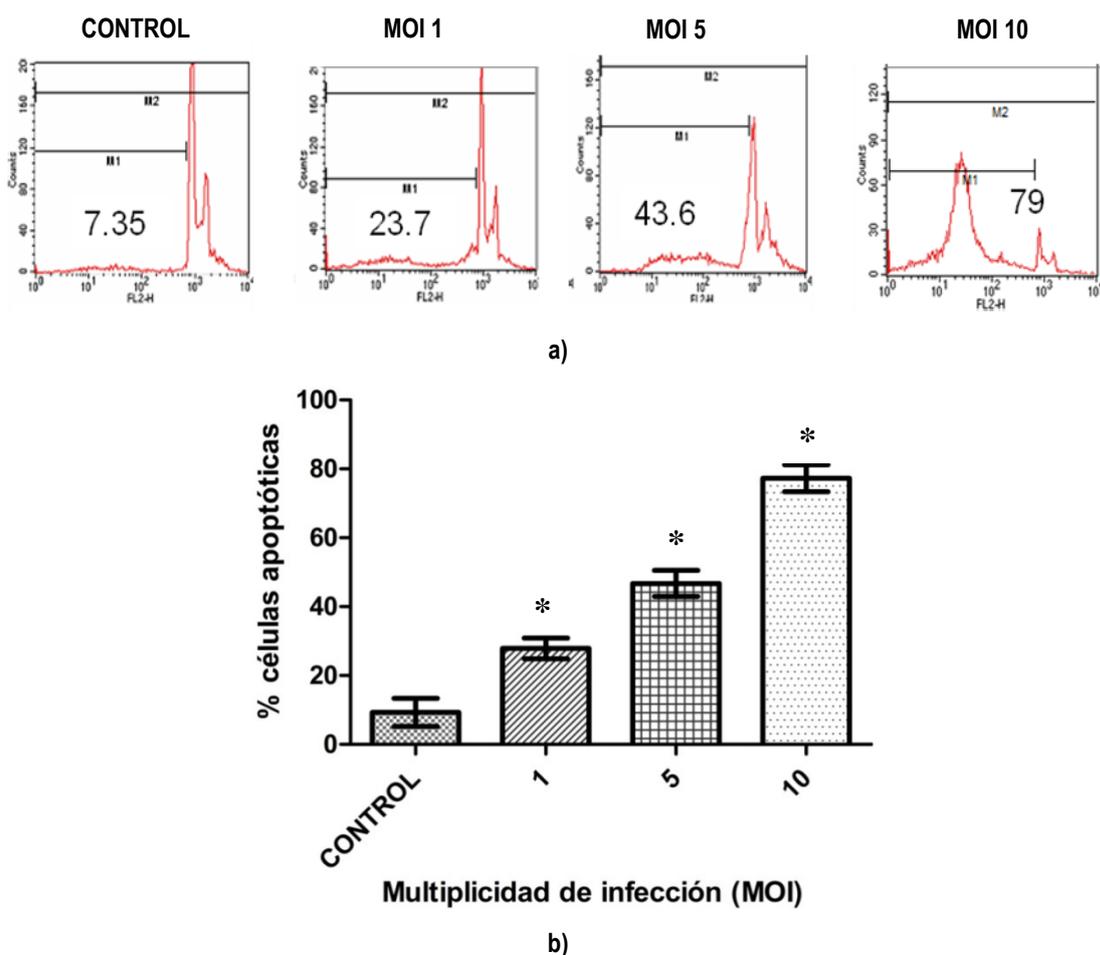


Figura 5. Análisis de muerte de células MDCK inducido por infección viral. Como se describe en Metodología, las células MDCK fueron incubadas con diferentes MOIs con el virus de influenza H1N1 por 24 hrs. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de células subhaploides por citometría de flujo para determinar el contenido de ADN. a) Histogramas representativos de 3 ensayos independientes. b) Se presentan los resultados gráficos de ensayos similares a los descritos en a). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de 3 ensayos independientes. La significancia estadística se determinó por la prueba de t-student (*), empleando una significancia de $P < 0.05$.

Como se observa en la Figura 5, se evaluó el efecto de la infección viral a diferentes MOIs con respecto al porcentaje de muerte celular. Las células sin virus mostraron un nivel basal promedio de 9.3 ± 4.1 de células subhaploides. En cambio, las células infectadas mostraron niveles significativamente mayores: 1) MOI 1, 27.9 ± 2.9 ; 2) MOI 5, 46.7 ± 3.8 ; 3) MOI 10, 77.3 ± 3.9 . Así mismo, por la prueba de t de Student, pudimos confirmar que los diferentes tratamientos presentaron resultados estadísticamente significativos, entre ellos y con respecto a las células control, esto es, el efecto de muerte celular inducido por una MOI de 1 fue diferente del tratamiento con una MOI de 5.

Adicionalmente, estos resultados nos permiten sugerir que la MOI adecuada para llevar a cabo los ensayos de infección en células MDCK es de 1, de tal forma que dará margen para observar cambios en el nivel de fragmentación de ADN inducido por los diferentes tratamientos

experimentales. Estos datos, en conjunto con la expresión de la proteína NS1, nos sugieren que nuestras condiciones de incubación en la línea celular MDCK con el stock de virus de influenza H1N1 conduce a la infección de las células.

Por otro lado, se llevó a cabo el ensayo de hemaglutinación, este método nos permite conocer de forma cualitativa la cantidad de partículas víricas presentes en nuestra solución de trabajo, gracias a la capacidad de la proteína HA de unirse a los residuos de ácido siálico de las células. Normalmente, los eritrocitos caerán al fondo de los pocillos de la microplaca, formando una mancha roja densa. Por ello, si existen partículas víricas, dado que cada partícula vírica se puede unir a varios eritrocitos formando una red, se observará una mancha roja uniforme, como se puede observar en la Figura 6a en las primeras diluciones del virus. En el ensayo se mezcla igual volumen de cada dilución de la muestra de virus con la suspensión de eritrocitos, y se incuban una hora a temperatura ambiente. En la Figura 6 se observa la gráfica de hemaglutinación hasta la dilución 1:160 para nuestra solución stock viral utilizada que fue de 5×10^7 pfu, la unidad de hemaglutinación (HAU) fue de 3200 HAU/ml.

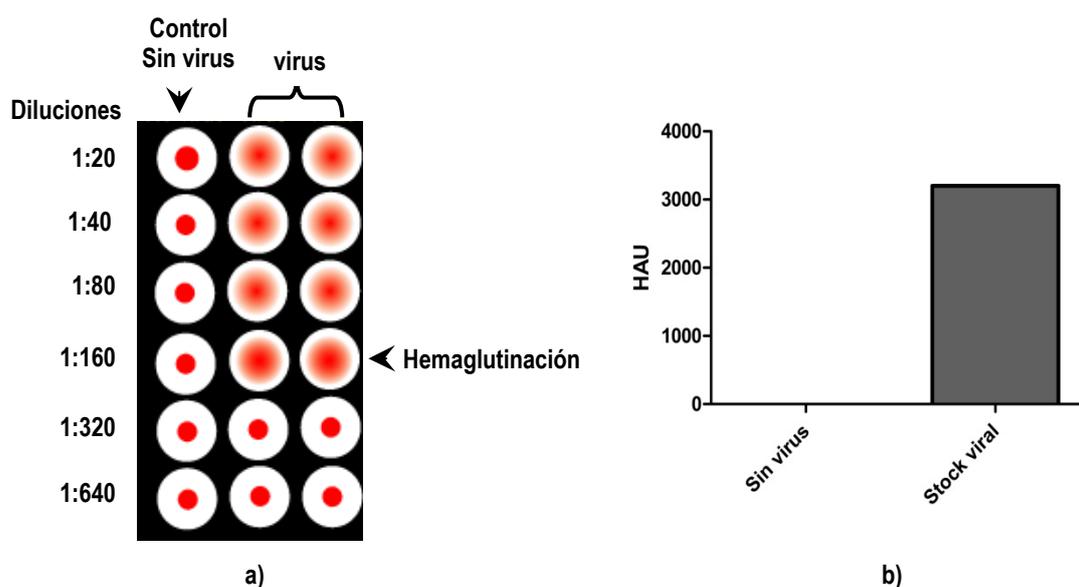


Figura 6. Ensayos de Hemaglutinación. a) Se presenta una imagen representativa del ensayo de hemaglutinación y b) se presentan el resultado gráfico de ensayos de hemaglutinación utilizando el stock viral con el título de 5×10^7 pfu, el cual fue de 3200 unidades de hemaglutinación por unidad de volumen (ml) (HAU/ml).

VI.4 Cambio en los receptores para TGF- β por la infección viral.

Debido a la infección viral, la célula regula a diferentes niveles su metabolismo y su capacidad de responder al medio, ya sea como un mecanismo de defensa o como un mecanismo viral que favorezca su replicación. Sin embargo, a la fecha no se ha descrito si los receptores para TGF- β se modulan debido a la infección por el virus de influenza, aunque existen reportes que muestran que su presencia en la superficie celular puede ser regulada en otros contextos celulares como el cáncer [6, 56, 63-65, 117]. Por esta razón, se realizaron ensayos de infección sobre las células MDCK y se evaluaron los niveles de los receptores para TGF- β . Para esto se realizaron dobles tinciones para los receptores I y II para esta citocina (T β RI y T β RII) y se analizaron por citometría de flujo (ver Metodología). Esta técnica nos permitió determinar las células que contienen ambos receptores en su superficie celular, y que por ello, podrían ser capaces de responder al estímulo con TGF- β .

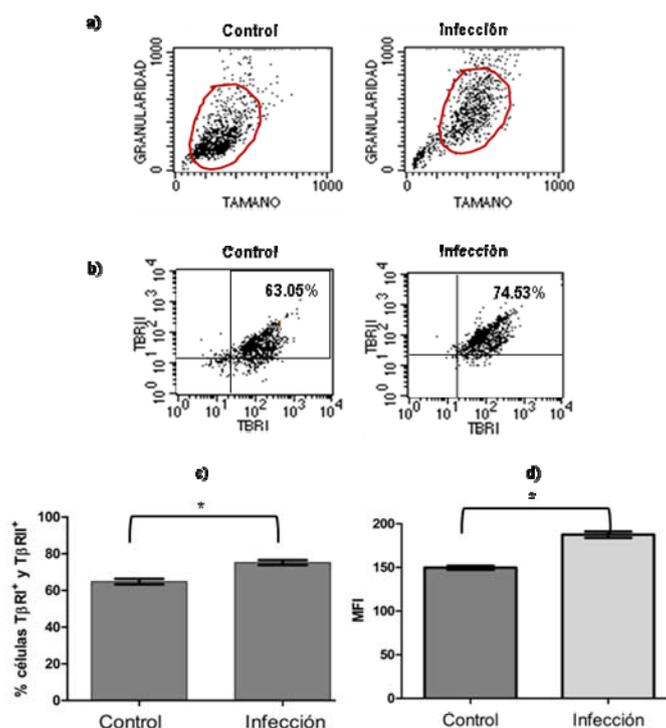


Figura 7. Cambio en los receptores para TGF- β I y II (T β RI y T β RII) en la infección viral. Análisis de células MDCK que fueron dobles positivas para T β RI y T β RII. Las células se infectaron a MOI 1, se recolectaron a las 24 horas post-infección y se fijaron con PFA al 1%, se llevaron a cabo dobles tinciones para observar células dobles positivas (ver Metodología). a) Imágenes representativas de la distribución de la población celular que permitieron discriminar la población de células muertas y vivas (círculo rojo), b) Imagen representativa de la población celular que mostró tinción doble para T β RI y T β RII; c) Análisis estadístico de células MDCK que se tiñieron para los receptores T β RI y T β RII. d) Análisis estadístico de los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenidos de células dobles positivos para los receptores T β RI y T β RII. El análisis estadístico se determinó por la prueba t-student (*) P<0.05.

En la Figura 7a se observan las imágenes de dot-blot representativas de la población total de células para los parámetros de tamaño y granularidad. Así mismo, se observa un dot-blot representativo del porcentaje de células T β RI+/T β RII+, presente en las células incluidas en el círculo de la Figura 7a, tanto para células control como células infectadas por 24 hrs.

Como se observa en esta Figura, el porcentaje de células positivas para ambos receptores en condiciones sin infectar mostraron un nivel basal promedio de 64.86 ± 2.64 , lo que nos muestra que estas células sí poseen receptores de membrana para esta citocina y por tanto podrían ser capaces de responder a esta citocina. Por otra parte, de manera interesante, las células infectadas mostraron niveles mayores al infectar con MOI 1, 75.2 ± 2.32 . Por la prueba de t de Student, pudimos confirmar que la infección induce un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células que presentan ambos receptores ($p=0.0221$): esto es, el efecto de la infección podría modificar el porcentaje de células responsivas para el TGF- β .

En el mismo sentido, al analizar la intensidad media de fluorescencia ("MFI" por sus siglas en inglés), observamos que la infección de las células MDCK indujo también un aumento significativo en el contenido de receptores por células (Figura 7d), de un valor de MFI para las células control 149.97 ± 3.88 a un valor de MFI en células infectadas de 187.61 ± 6.42 ($p=0.00165$). Estos datos sugieren que los niveles de los receptores podrían ser regulados como consecuencia de la infección viral. Conviene resaltar que este aspecto no ha sido reportado a la fecha y por tanto se desconoce el mecanismo para llevar a este cambio en los receptores.

VI.5 Modulación de los niveles de Smad 2/3, pSmad 2/3, P38 y pP38 en células MDCK infectadas.

Debido a que no existe información en la literatura sobre los niveles basales y de activación de las proteínas Smad 2/3, en el presente trabajo también nos dimos a la tarea de identificar los niveles basales y de activación de estas proteínas ante la infección por el virus de influenza. Esto resulta particularmente interesante después de nuestros resultados anteriores, donde los niveles de los receptores parecen aumentar de manera significativa por efecto de la infección con el virus influenza. Es por esta razón que resulta relevante el conocimiento de las vías de señalización activadas por TGF- β , y como hemos discutido en la parte de introducción, se ha demostrado que el TGF- β podría ser activado por la proteína NA viral y con ello, la modulación de sus receptores y la activación de vías de señalización dependientes de TGF- β . En la Figura 8, se muestra la cinética de activación de Smad 2/3 de 1 a 24 horas post-infección.

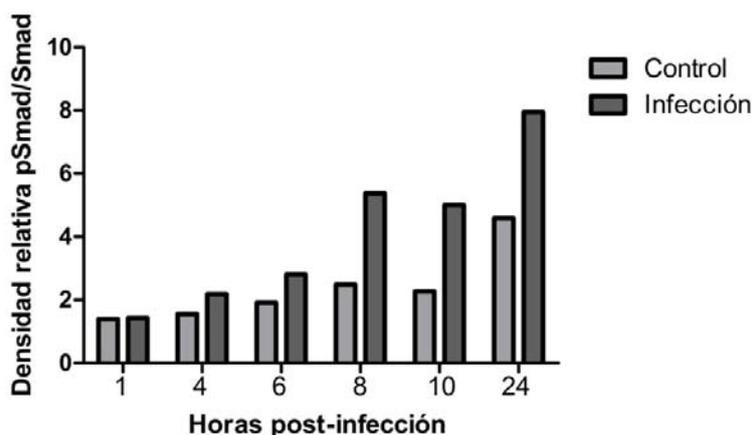
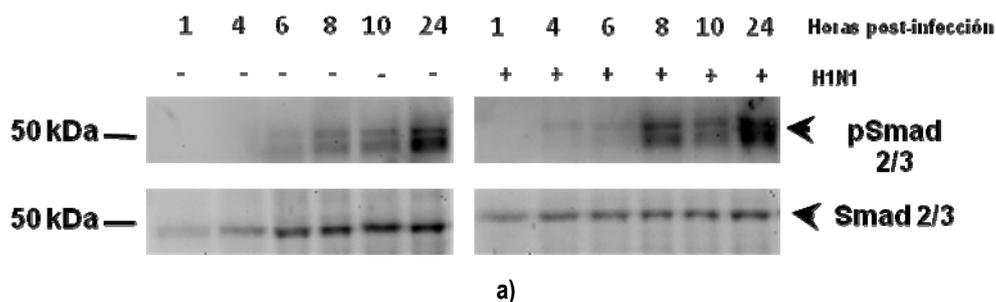


Figura 8. Modulación de los niveles de Smad 2/3 y su activación por fosforilación (pSmad2/3) durante la infección viral. Las células MDCK fueron infectadas con el virus de influenza H1N1 con MOI 1, y se incubaron a diferentes tiempos post-infección. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE/Western blot para las proteínas Smad2/3 y pSmad2/3. a) Imagen de un ensayo de infección viral por Western blot. b) Gráfica del análisis por densitometría de los niveles relativos de pSmad con respecto a Smad, en condiciones control y de infección a diferentes tiempos post-infección. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad) al utilizar la imagen mostrada en a).

En la Figura 8a podemos notar que los niveles de la activación de Smad en las células infectadas por el virus influenza, aumentan de forma considerable con respecto a las células control a partir de las 8 horas post-infección. Por otro lado, el análisis por densitometría de los niveles de pSmad 2/3 que se muestran en la Figura 8b, muestra que la activación de Smad si aumentan a partir de las 8 horas en las células infectadas. Estos resultados sugieren que los niveles de fosforilación y, por ende, de activación de Smad 2/3 aumentan como consecuencia de la infección viral desde las 8 hrs hasta las 24 hrs post-infección. Interesantemente estos eventos de señalización coinciden con los cambios observados en muerte celular y modulación de los niveles de receptores, por lo que se podría postular que estos eventos están relacionados. Sin embargo, estos datos necesitan ser corroborados en ensayos posteriores, ya que se trata de un solo ensayo.

Por otro lado, también se analizó la activación de la proteína MAPk p38 en la infección por influenza, ya que se ha reportado que TGF- β podría participar en la activación de esta

proteína como parte de la vía de señalización independiente de Smads; además, se ha reportado ampliamente que esta proteína es activada durante a la infección viral [94]. En la Figura 9 se muestra la imagen obtenida mediante ensayos de western blot, en donde se observa que los niveles de activación de p38 se mantienen de manera casi constante a lo largo de la cinética de infección, sin embargo la intensidad de la banda fosforilada aumenta en las condiciones de infección y a las 24 horas.

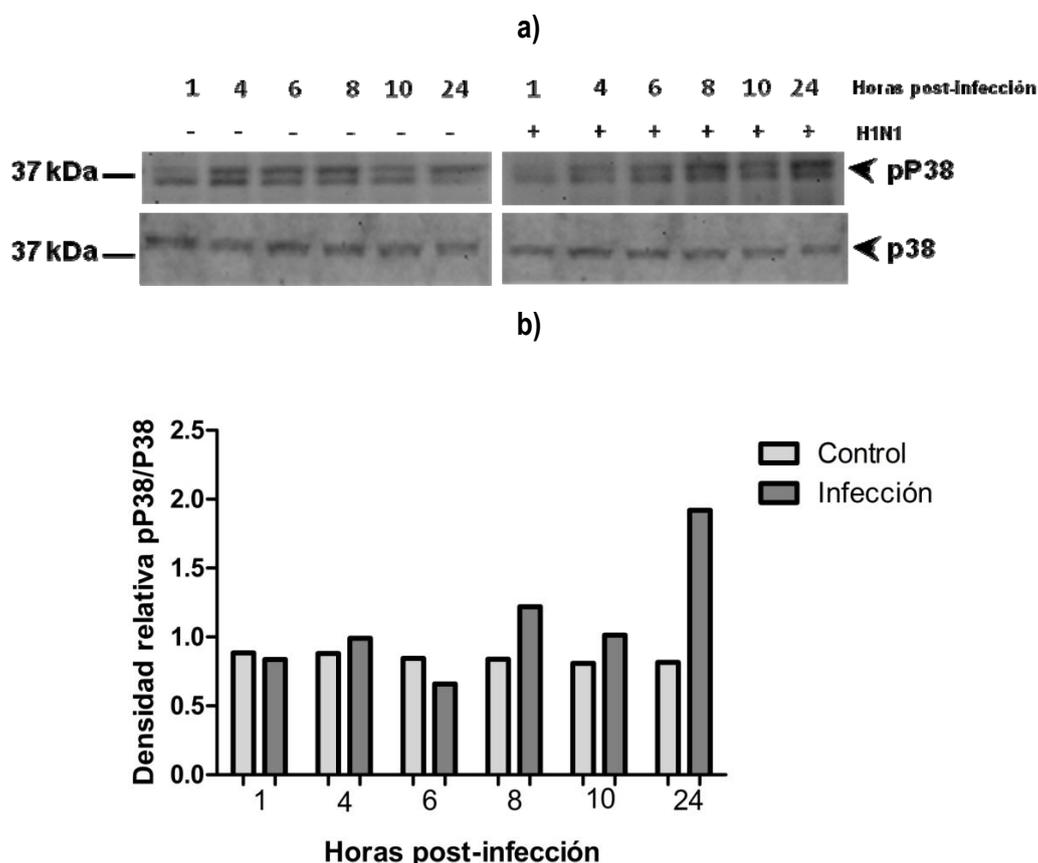


Figura 9. Modulación de los niveles de p38 y su activación por fosforilación (pP38) durante la infección viral. Las células MDCK fueron infectadas con 1 MOI de virus de Influenza H1N1 y se incubaron a diferentes tiempos post-infección. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE/Western blot para las proteínas P38 y pP38. a) Imagen de un ensayo de infección viral por Western blot. Las bandas corresponden a la forma activa y a la inactiva para p38, y el anticuerpo utilizado ya ha sido utilizado por varias referencias [118, 119]. b) Análisis por densitometría de los niveles relativos de pP38 con respecto a p38, en condiciones control y de infección a diferentes tiempos post-infección. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad) al utilizar la imagen mostrada en a).

El análisis densitométrico de la activación de p38, mostrado en la Figura 9b, confirma lo observado en el blot, donde los niveles de p38 se mantienen similares en las condiciones control y en las células infectadas a los tiempos menores a 24 hrs. Sin embargo, a las 24 horas post-infección los niveles de activación de p38 aumenta de manera considerable con respecto al control, dato que ya ha sido corroborado por otros trabajos, cuya implicación se ha atribuido al estrés y la apoptosis celular inducida por la infección viral [94, 120].

VI.6 Efecto de TGF- β sobre la muerte de células MDCK.

Dado que se ha reportado previamente que la estimulación con TGF- β induce la apoptosis celular en diferentes modelos celulares [74-78], se evaluó la capacidad de esta citocina en inducir la fragmentación nuclear. Por ello, para determinar la concentración adecuada de TGF- β para la estimulación *in vitro* de las células MDCK, se evaluó el efecto del TGF- β para inducir muerte celular por fragmentación de ADN a las 24 horas (Figura 10).

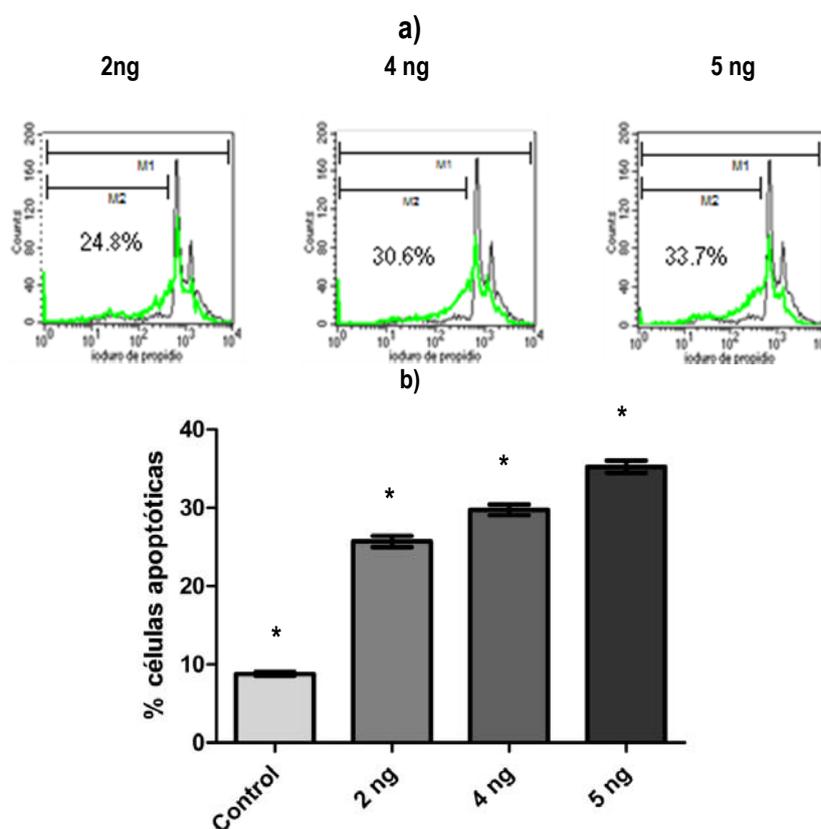


Figura 10. Efecto de TGF- β sobre la muerte de células MDCK. Células MDCK (1×10^6 cel/pozo) fueron incubadas por 24 hrs con diferentes concentraciones de TGF- β . Posteriormente, se determinó la muerte celular por determinación del porcentaje de células subhaploides (ver Metodología). a) Se muestran histogramas representativos de 3 ensayos independientes, y los porcentajes de células correspondientes a estos experimentos. (La línea negra representa el control, sin estimulación, y la línea verde representa las células estimuladas a diferentes concentraciones de TGF- β , el desplazamiento de la línea verde con respecto a la negra es la cantidad de células que muestran fragmentación de ADN debido a la tinción con ioduro de propidio).

b) Análisis estadístico del efecto de TGF- β sobre la muerte celular en la línea MDCK. Las gráficas se obtuvieron al utilizar los resultados obtenidos en a). El análisis estadístico se realizó empleando la prueba T-student (*) $P < 0.05$.

En la Figura 10a se muestran los histogramas representativos del efecto de incubar las células MDCK con diferentes concentraciones de TGF- β sobre su muerte celular. Mientras tanto, en la Figura 10b se presenta la representación gráfica de 3 ensayos independientes de incubación con TGF- β en las células MDCK. Podemos observar que el TGF- β a todas las concentraciones probadas (de 2 hasta 5 ng/ml) fue capaz de provocar un efecto apoptótico sobre el 20-25% de las células, y este efecto fue significativo en comparación con las células sin tratar. Al evaluar estadísticamente las diferencias entre los tratamientos, observamos una diferencia significativa en todos ($p > 0.00091$). Estos datos sugieren que el efecto del TGF- β sobre la muerte celular, es dependiente de su concentración, y también sugiere que la concentración de 5 ng/ml de TGF- β es conveniente para observar un efecto apoptótico apreciable con respecto a las células control, útil para los análisis posteriores.

VI.7 Efecto de TGF- β sobre la expresión de sus receptores de superficie.

Ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, que TGF- β en diferentes contextos celulares es capaz de modular ya sea aumentando o disminuyendo los niveles de sus receptores de superficie, por esta razón era necesario estandarizar y analizar el efecto de TGF- β sobre los receptores de superficie en la línea celular MDCK. En la Figura 11 se observan histogramas representativos donde se evalúa el efecto de la incubación del TGF- β sobre los niveles de las células T β RI⁺/T β RII⁺ en la superficie de las células MDCK porcentaje de células dobles positivas para los receptores de TGF- β debido a la estimulación con esta citocina con respecto a las células control a las 24 horas post-infección.

Como se observa, la estimulación con TGF- β indujo un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para ambos receptores debido a con respecto a las células control, de 64 ± 86 a 89.34 ± 2.52 (Figura 11c). Esto parece confirmar observaciones previas donde el efecto de esta citocina influye sobre la expresión y sensibilización de las células blanco. Sin embargo, de manera aparentemente paradójica, al analizar los valores de MFI, estos mostraron que el tratamiento con TGF- β parecía disminuir el nivel de receptores en la superficie celular, de 150.96 ± 6.5 , en el control a 88.09 ± 7.8 en células estimuladas con TGF- β , siendo estos valores comparativamente significativos con la prueba t de student ($p = 0.0014$) (figura 11d), en las células tratadas. En su conjunto estos datos sugieren que el tratamiento con TGF- β de las células MDCK induce un aumento en el porcentaje de células responsivas a las citocina, pero al mismo tiempo ocasiona la disminución del nivel de receptores en superficie por célula. Obsérvese que este efecto resulta diferente del ocasionado por la infección viral, el cual

ocasiona una menor estimulación en el porcentaje de células doble positivas, pero en cambio, no modificaron su nivel de receptores en superficie.

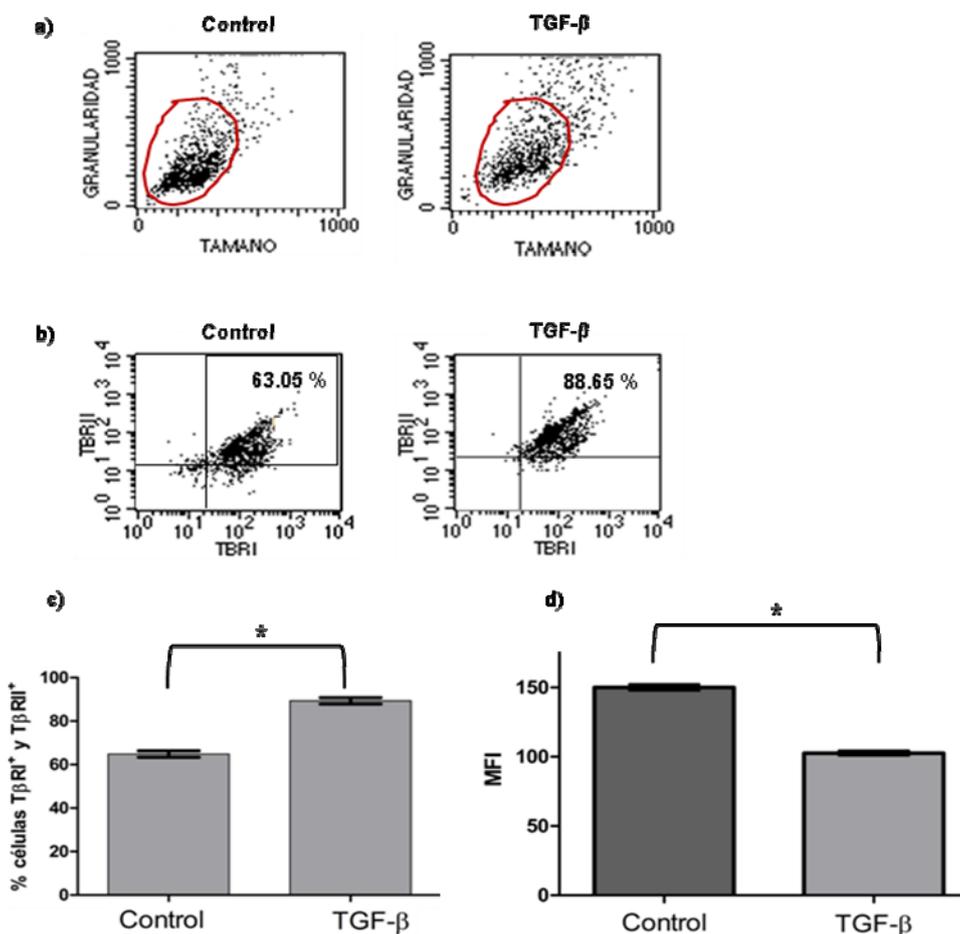
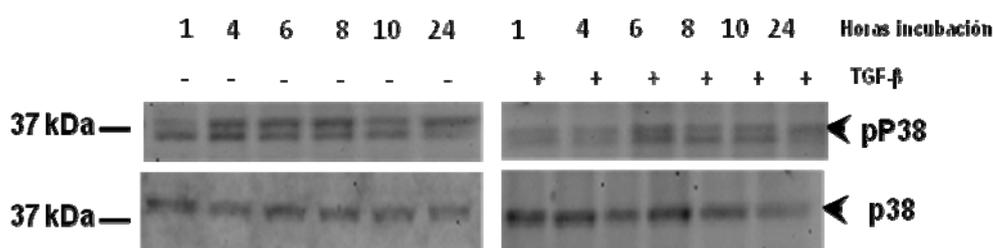


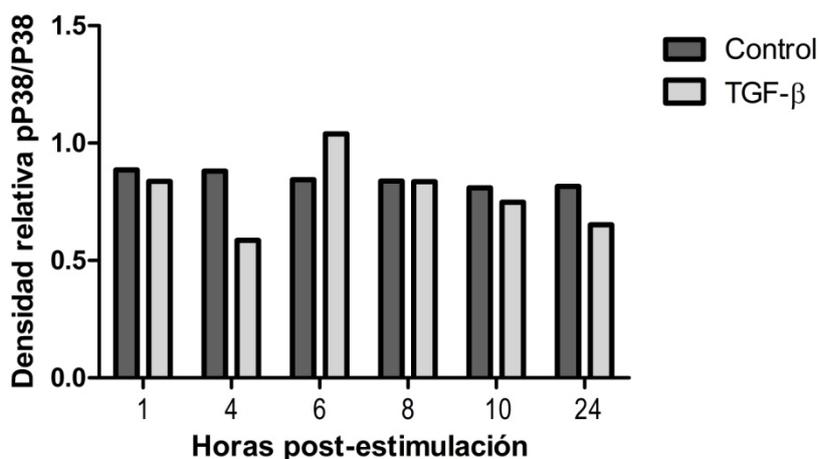
Figura 11. Efecto de TGF- β sobre la expresión de sus receptores de superficie. Análisis de células MDCK que fueron dobles positivas para los receptores I y II de TGF- β . Las células se estimularon con 5ng/ml de TGF- β se cosecharon a las 24 horas y se fijaron con PFA al 1%. Se llevaron a cabo dobles tinciones para observar células dobles positivas. a) Imágenes representativas de la distribución de la población celular que permitieron discriminar la población de células muertas y vivas (círculo rojo), b) Imagen representativa de la población celular que mostró tinción doble para T β RI y T β RII; c) Análisis estadístico de células MDCK que se tiñieron para los receptores T β RI y T β RII. d) Análisis estadístico de los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenidos de células dobles positivas para los receptores T β RI y T β RII. El análisis estadístico se determinó por la prueba t-student (*) P<0.05.

VI.8 Modulación de los niveles de activación de p38 en células MDCK debido al tratamiento con TGF- β .

Como ya se ha discutido uno de nuestro objetivos consiste en caracterizar la activación de vías de señalización independientes de Smads por el TGF- β , por ello, datos que se obtuvieron en nuestro grupo de trabajo, mostraron que la incubación con TGF- β (5ng/ml) en otros modelos celulares (tesis de maestría en Farmacia, Luz María Mejía C., 2007) era capaz de activar la vía de señalización canónica 30 minutos posteriores a la estimulación. Por esta razón se analizó la activación de p38 debido a la incubación con TGF- β como se muestra en la Figura 12.



a)



b)

Figura 12. Modulación de los niveles de p38 y su activación por fosforilación (pP38) debido a la estimulación con TGF- β . Las células MDCK se incubaron con 5ng/ml de TGF- β y se cosecharon a diferentes tiempos. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE/Western blot para las proteínas P38 y pP38. a) Imagen representativa de un ensayo de infección viral por Western blot.. b) Análisis por densitometría de los niveles relativos de pP38 con respecto a P38, en condiciones control y de estimulación con TGF- β a diferentes tiempos. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad) al utilizar la imagen mostrada a).

Con los datos obtenidos y mostrados en la Figura 12a, se hace notar que los niveles de activación de p38, no se modifican debido al tratamiento con 5ng/ml de TGF- β ni a lo largo de tiempo, datos que se confirman con el análisis por densitometría mostrados en las Figura 12b.

Esta información podría sugerir que la incubación con TGF- β no modifica los niveles de activación de p38 y, por tanto, parecería no provocar la estimulación de p38. Aunque estos resultados podrían parecer contradictorios con el efecto que tiene la incubación del TGF- β con los receptores y la activación de Smads, hay que tomar en cuenta que esta proteína no solo se activa mediante este mecanismo y es una proteína activada por condiciones de estrés celular.

VI.9 Efecto del tratamiento con TGF- β sobre la infección con el virus influenza.

Con el objetivo de caracterizar la posible participación del TGF- β durante la infección por el virus influenza, se analizó su posible efecto en la infección viral. Por ello, se estimularon las células MDCK una hora previa a la infección por el virus de influenza, con una concentración de 5 ng/ml de TGF- β y se evaluó su efecto mediante tres tipos de análisis: 1) muerte celular, 2) inducción de receptores T β RI/T β RII y, 3) expresión de la proteína NS1.

En una primera fase, se evaluó el efecto de la infección por el virus influenza sobre las células MDCK sobre la inducción de muerte celular. En la Figura 13 se observa un ensayo representativo que muestra que la preactivación de las células MDCK por el TGF- β durante una hora.

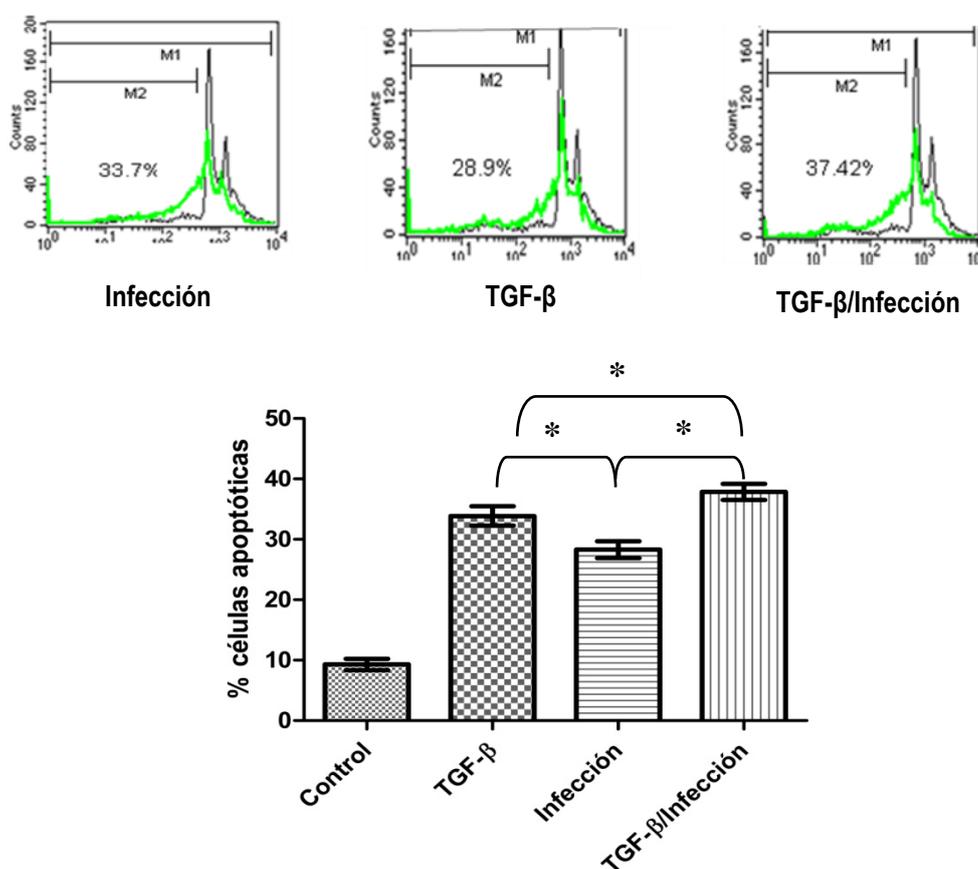


Figura 13. Análisis de muerte celular debido a la estimulación con TGF- β y/o infección con el virus influenza. Histogramas representativos de las células MDCK que presentan fragmentación nuclear del ADN por estimulación con: TGF- β , infección viral e incubación previa con TGF- β a la infección viral. Las células se estimularon y cosecharon a las 24 horas para su análisis por citometría de flujo. (La línea negra representa el control, es decir células sin estimulación, y la línea verde representa las células estimuladas a diferentes concentraciones de TGF- β , el desplazamiento de la línea verde con respecto a la negra es la cantidad de células que muestran fragmentación de ADN debido a la tinción con yoduro de propidio). b) Los resultados representan 3 ensayos independientes similares al mostrado en a), e indican el porcentaje de células con fragmentación del ADN. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba T-student (*) $P < 0.05$.

En la Figura 13 se muestra que la estimulación previa a la infección viral con TGF- β (37.8 ± 1.33) incrementa de manera estadísticamente significativa el porcentaje de células en

apoptosis a las 24 horas post-infección con respecto a las células infectadas a MOI de 1 (28.3 ± 1.4). Además este nivel de muerte celular fue significativamente mayor que la simple estimulación con TGF- β (33.6 ± 1.55). Estos datos corroboran que TGF- β tiene un efecto apoptótico por sí solo, sin embargo, la muerte celular inducida por esta citocina debido a una estimulación previa a la infección viral por influenza, es ligeramente mayor con respecto a la estimulación simple, aunque el valor obtenido por la prueba t de student es significativo ($p=0.03$), es posible que la inducción de muerte celular sea un mecanismo viral que a la fecha es un punto controvertido en el tema de infecciones virales, puesto que no se entiende con certeza el papel de este proceso en las infecciones virales pero que sería necesario explorar.

VI.10 Cambio en los receptores T β RI y T β RII debido a la estimulación con TGF- β y la infección viral.

Como ya hemos mencionado, los virus al entrar a las células, utilizan su maquinaria celular para multiplicarse y producir más progenie viral, controlando a diferentes niveles los mecanismos celulares que favorezcan la infección viral. Ya que a la fecha no se ha reportado la modulación de los receptores para TGF- β debido a la infección por el virus de influenza, ni la modulación de estas proteína debido a la co-incubación con TGF- β y la infección viral, este trabajo mostró en secciones previas que los niveles de los receptores para esta citocina se modifican de manera significativa debido a la infección (ver Figura 7), por este motivo, también se realizaron ensayos en donde se estimuló con TGF- β durante una hora previo a la infección viral, datos que se muestran en la Figura 14.

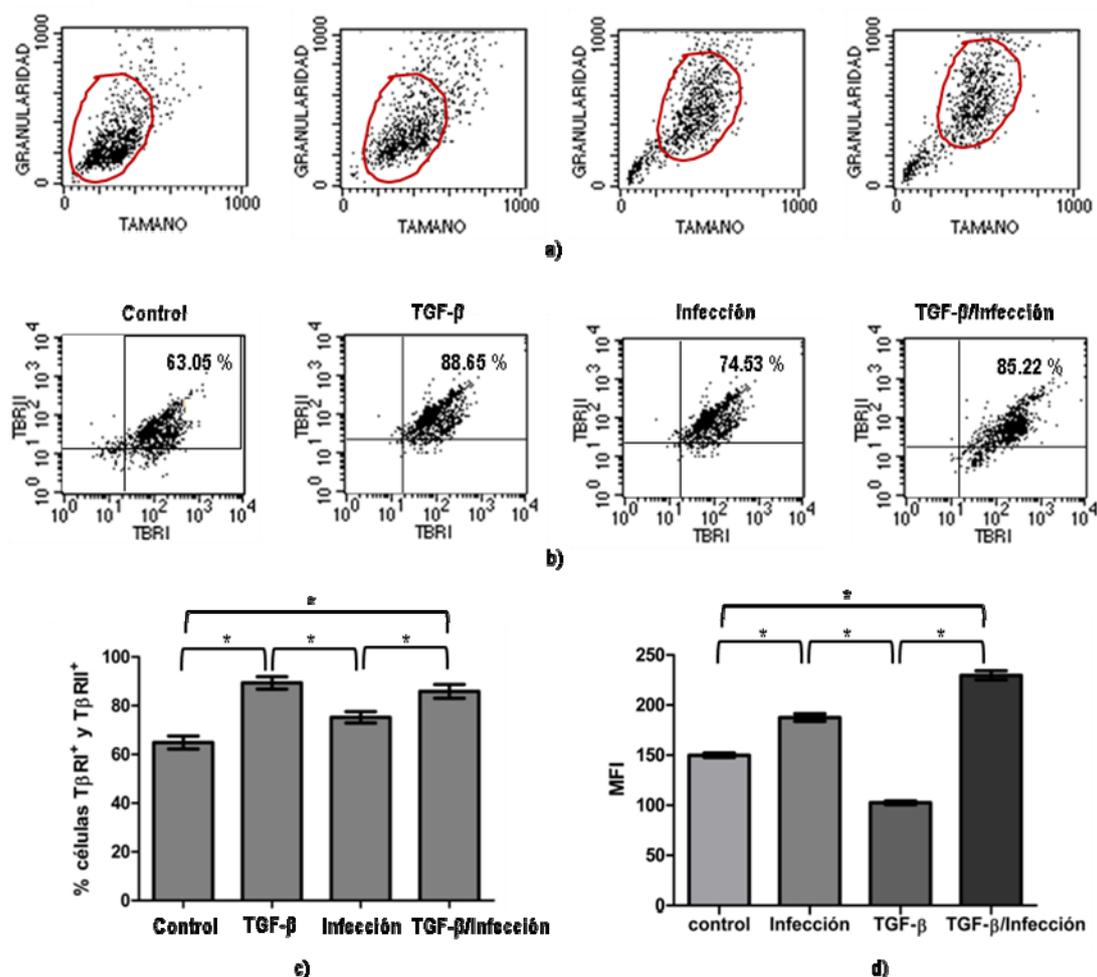


Figura 14. Efecto sobre la expresión de los receptores de superficie T β RI y TBRII debido a la estimulación con TGF- β y la infección viral. Análisis de células MDCK que fueron dobles positivas para los receptores I y II de TGF- β , por estimulación con TGF- β , infección viral e incubación previa con TGF- β seguida de la infección viral, se cosecharon a las 24 horas y se fijaron con PFA al 1%. a) Imágenes representativas de la distribución de la población celular que permitieron discriminar la población de células muertas y vivas (círculo rojo), b) Imágenes representativas de la población celular que mostró tinción doble para T β RI y TBRII; c) Análisis estadístico de células MDCK que se tiñeron y fueron positivas para ambos receptores T β RI y TBRII. d) Análisis estadístico de los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenidos de células dobles positivos para los receptores T β RI y TBRII. El análisis estadístico se determinó por la prueba t-student (*) P<0.05.

Como se observa en la Figura 14, el porcentaje de células MDCK positivas para ambos receptores cuando se estimula con TGF- β previo a la infección es de 85.88 ± 2.82 . En cambio, como se mostró de forma previa, las células infectadas mostraron niveles significativamente menores al infectar con MOI de 1, 75.2 ± 2.32 ($p=0021$). Así mismo, el porcentaje de células positivas para ambos receptores debido a la estimulación simple con TGF- β fue de 89.3 ± 2.5 . De estos resultados se podría sugerir que el aumento en el porcentaje de células T β RI⁺ y TBRII⁺, se deben en gran medida al efecto inducido por el TGF- β .

Por otro lado, el valor de intensidad media de fluorescencia (MFI) para la estimulación con TGF- β e infección fue de 229.78 ± 7.84 . Recordando datos ya mencionados en las secciones VI.4 y VI.7 el efecto de la infección viral ocasionó un aumento en el porcentaje de células T β RI⁺/T β RII⁺ lo cual concuerda claramente con el valor MFI. Estos resultados fueron diferentes al efecto observado con la sola estimulación por el TGF- β , el cual ocasionó un aumento en el porcentaje de T β RI⁺/T β RII⁺, al tiempo que indujo una disminución en el nivel de receptores por célula (menor MFI), en comparación con las células control. Ahora, al evaluar el efecto de la estimulación previa a la infección con el virus influenza, observamos un aumento en el porcentaje de células sensibles a la citocina como en el nivel de receptores por célula. De estos datos se podría sugerir que la infección viral podría modular la expresión de receptores por mecanismos diferentes al empleado por la simple estimulación por la citocina. Sin embargo los motivos y las consecuencias de esta regulación se necesitan estudiar con más detalle.

VI.11 Efecto de la incubación con TGF- β en la infección viral sobre la expresión de la proteína NS1.

Como se ha mencionado en secciones previas, aún se desconoce el papel que TGF- β tiene en los mecanismos de infección por el virus influenza, sin embargo en un estudio con células epiteliales humanas *in vitro*, se observó que el tratamiento con TGF- β inducía un incremento en la síntesis de proteínas del virus respiratorio sincisial (RSV) [93], por esta razón se estudió el efecto de esta citocina sobre la infección viral como ya se ha estado describiendo en las 3 secciones anteriores.

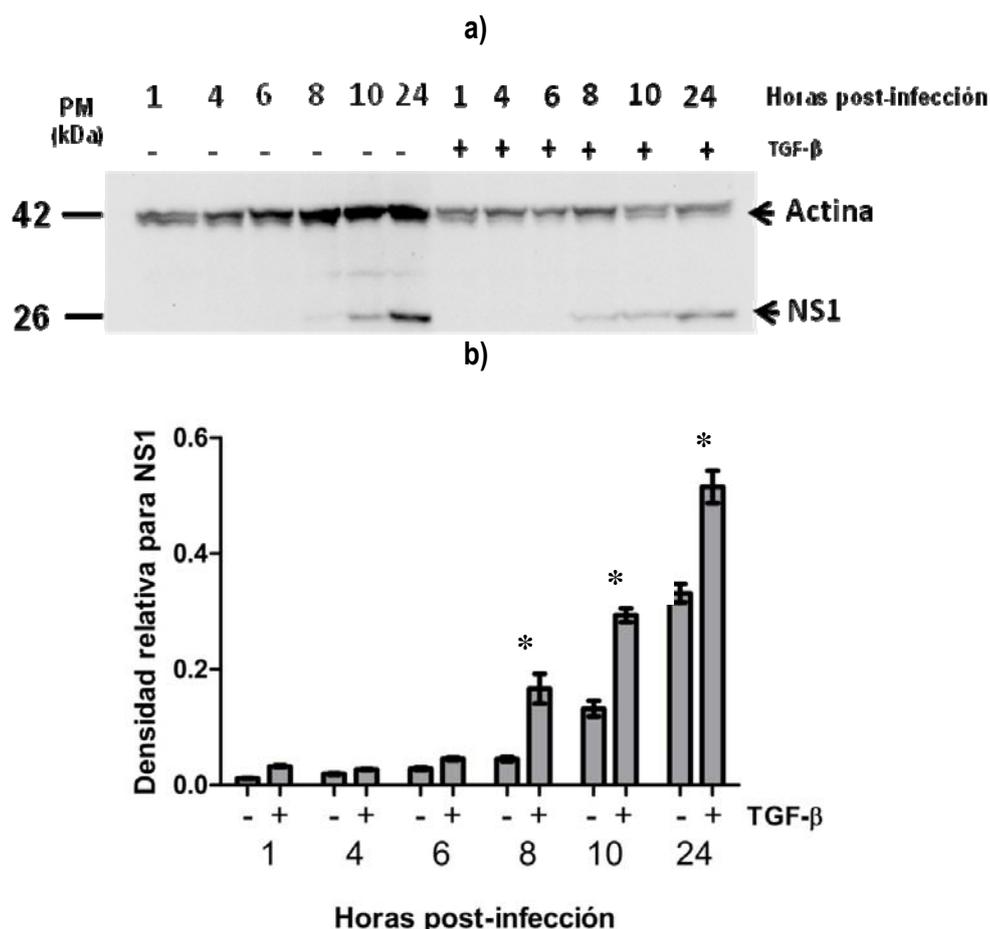


Figura 15. Síntesis de la proteína NS1 durante la infección viral y la estimulación previa con TGF- β . Las células MDCK fueron infectadas con MOI 1 de virus influenza H1N1 y se incubaron a diferentes tiempos post-infección, un grupo de células MDCK fueron incubadas con TGF- β (5 ng/ml) previo a la infección. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE/Western blot para las proteínas NS1 y actina como control de carga. a) Imagen representativa de tres ensayos independientes de infección viral, por Western blot. b) Análisis por densitometría de los niveles relativos de la proteína NS1 con respecto al control de carga que es actina. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad). Los resultados representan 3 ensayos independientes de western blot e indican la densidad relativa para NS1. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba T-student (*) $P < 0.05$.

En la Figura 15 se observa una cinética de infección representativa, de tres ensayos independientes, donde se revelaron en la misma membrana de nitrocelulosa las proteínas NS1 (26 kDa) y actina (42 kDa). Como se puede notar, en la Figura 15a, hasta el tiempo de infección de 6 hrs no se aprecia la proteína NS1, sin embargo a las 8 hrs se observa una ligera cantidad de esta proteína. Esta cantidad aumenta significativamente a las 10 y 24 hrs post-infección. Por otro lado, cuando se incubó previamente con TGF- β se puede apreciar la banda correspondiente a la proteína NS1 a partir de las 8 horas post-infección que aumenta de manera significativa a las 10 y 24 horas. Estos datos nos sugieren que TGF- β tiene cierto impacto en la síntesis de

proteínas virales, por esa razón se hizo un análisis por densitometría que se muestra en la Figura 15b, que nos permite apreciar de manera más precisa este efecto.

En la Figura 15b, se observa el análisis estadístico de la síntesis de NS1, como se puede notar en la Figura 15a no era apreciable la diferencia en la intensidad de las bandas para NS1 en ambas condiciones, sin embargo, el análisis densitométrico nos sugiere que la incubación previa con TGF- β , parece favorecer la síntesis de la proteína viral desde el tiempo de 8 hrs post-infección. Posiblemente este sea un mecanismo favorable para la infección viral, ya que a partir de las 8 horas la síntesis de NS1 en las células que fueron tratadas previo a la infección con TGF- β , aumenta significativamente con respecto a la infección simple. Estos datos son relevantes ya que no existen reportes a la fecha que muestre que esta citocina tiene un efecto directo en la replicación viral.

VI.12 Modulación de los niveles de activación de Smad 2/3 y P38 debido a la incubación con TGF- β y la infección viral.

Finalmente y como se ha venido discutiendo a lo largo de este trabajo, es de gran relevancia conocer los mecanismos bajo los cuales esta citocina lleva a cabo sus funciones en la célula y por los cuales observamos diferentes respuestas como es la inducción de apoptosis. Por esta razón, se realizó un ensayo por Western blot que nos permitió obtener un panorama general de la modulación de la activación de las proteínas Smad y p38. En la Figura 21 se muestra un análisis por Western blot del efecto sobre las células de la estimulación con TGF- β y su infección, sobre la presencia de Smad2/3 y sus formas fosforiladas PSmad 2/3.

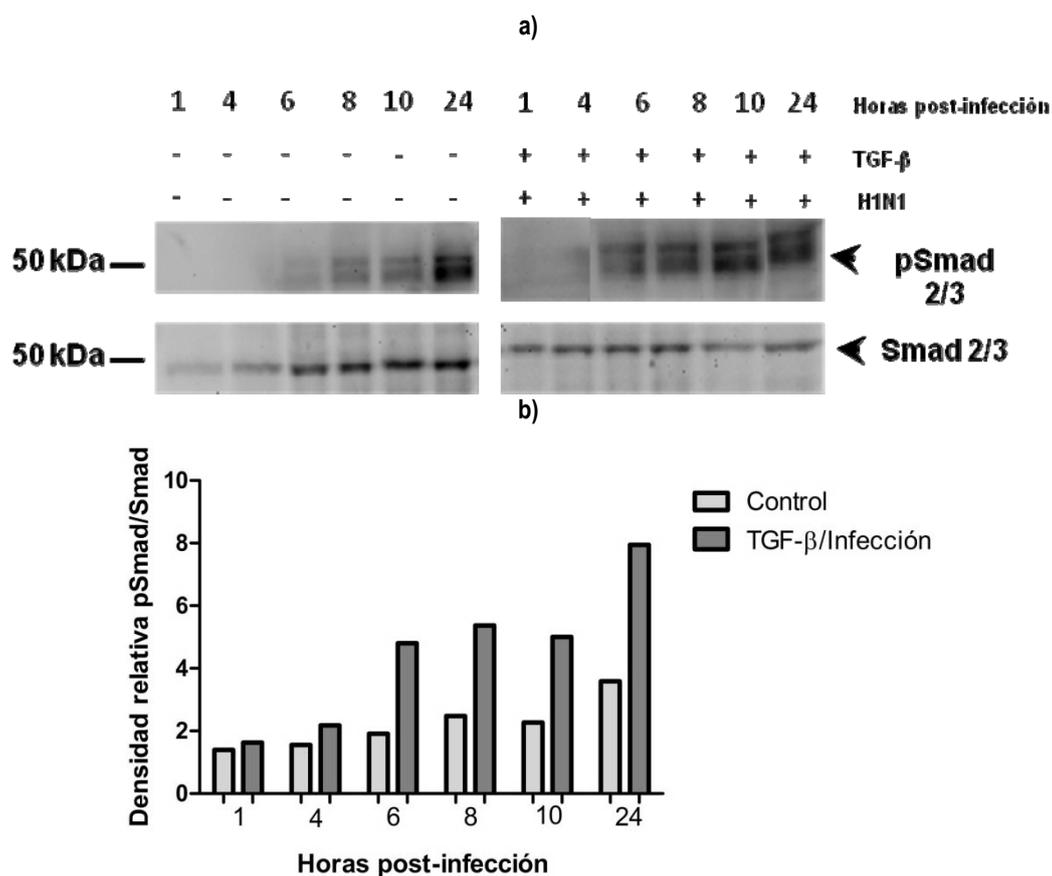


Figura 16. Modulación de los niveles de Smad y su activación por fosforilación (pSmad 2/3) debido a la incubación con TGF- β y la infección viral. Las células MDCK fueron estimuladas con TGF- β (5 ng/ml) e infectadas con MOI 1 de virus influenza H1N1 e incubadas a diferentes tiempos post-infección. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizadas por SDS-PAGE/Western blot para las proteínas Smad2/3 y pSmad2/3. a) Imagen de un ensayo de infección viral por Western blot. b) Análisis por densitometría de los niveles relativos de pSmad 2/3 con respecto a Smad, en condiciones control y de estimulación con TGF- β e infección viral a diferentes tiempos. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad) al utilizar la imagen mostrada en la Figura a).

Como se puede notar en la Figura 16a los niveles de activación para Smad 2/3 si aumentan en respuesta al estímulo con TGF- β y la infección a partir de las 6 horas post-infección, cuando se compara con respecto al control. Estos datos se confirman cuando la imagen es analizada por densitometría como se muestra en b, donde los niveles relativos de Smad fosforilada aumentan con respecto a las células control.

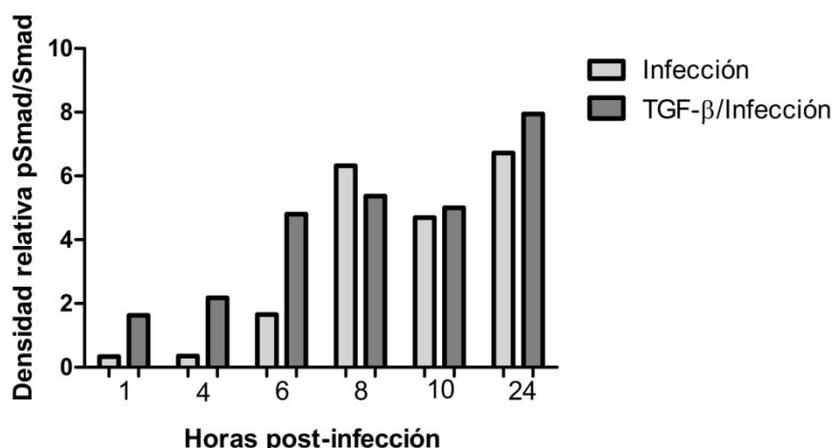
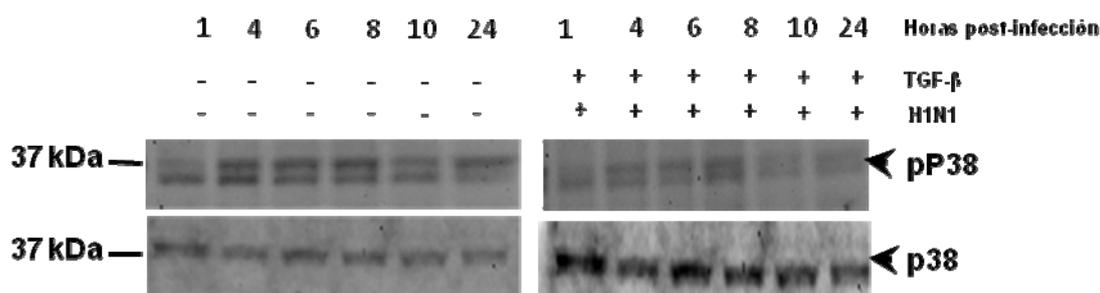


Figura 17. Niveles de Smad 2/3 y pSmad 2/3 debido a la estimulación previa con TGF- β y la infección viral. Gráfica del análisis por densitometría de los niveles relativos de pSmad 2/3 con respecto a Smad, en condiciones infección y de estimulación con TGF- β e infección viral a diferentes tiempos. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad).

Por su parte en la Figura 17 se muestra el análisis por densitometría del western blot que corresponde a la simple infección viral (ver Figura 8) y de estimulación previa a la infección con TGF- β . Aunque se trata de un ensayo, estos datos preliminares nos sugieren que la infección por sí misma induce la activación de estas proteínas alcanzando un máximo cerca de las 8 horas y manteniéndose hasta las 24 horas. Mientras tanto, la incubación previa con TGF- β estimula la fosforilación de estas proteínas 2 hrs antes que la infección viral. Esto podría sugerir que el efecto del TGF- β impacta sobre los eventos de señalización estimulados por la infección viral.

Por otro lado, se analizaron los niveles de fosforilación de la proteína p38, entre las células control y células estimuladas con TGF- β e infectadas. En estas circunstancias, el nivel basal de fosforilación en células control, fue similar durante toda la cinética. Por su parte, la estimulación e infección parece inducir un cambio notable en el nivel de fosforilación. Conviene recordar que la simple infección con el virus ocasionó un aumento importante en la fosforilación de p38 a las 24 hrs, situación que parece desaparecer por efecto de la estimulación previa con el TGF- β .



a)

b)

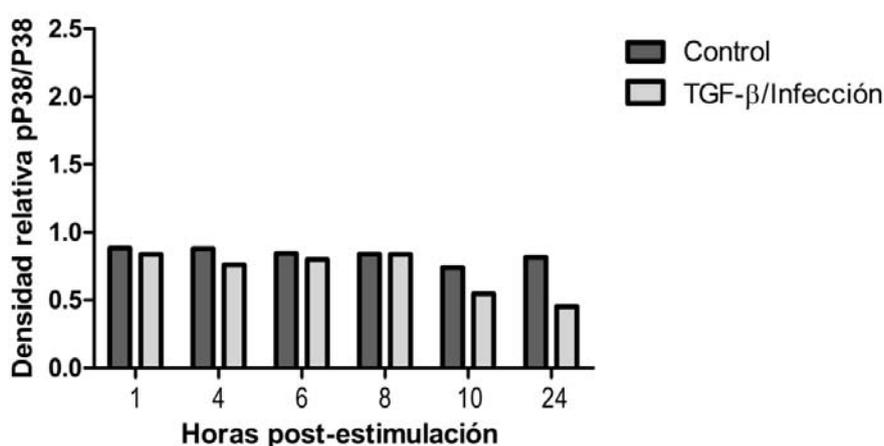


Figura 18. Cinética de modulación de los niveles de p38 y su activación por fosforilación (pP38) debido a la estimulación con TGF- β e infección viral. Las células MDCK se incubaron con 5ng/ml de TGF- β por una hora, se infectaron con MOI 1 y se cosecharon a diferentes tiempos. Posteriormente, 30 μ g de proteína de los extractos celulares fueron analizados por SDS-PAGE/Western blot para las proteínas P38 y pP38. a) Imagen de un ensayo de infección viral por Western blot. b) Análisis por densitometría de los niveles relativos de pP38 con respecto a P38, en condiciones infección y de estimulación con TGF- β e infección viral a diferentes tiempos. El análisis por densitometría se llevó a cabo mediante el uso del programa Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad).

Estos datos se ven reforzados por el análisis densitométrico que se muestra en la Figura 18b, ya que no se observaron cambios en los niveles de activación para la proteína p38 con respecto a las células control desde 1 hasta 6 horas post-infección. Es más, parece que el nivel de activación de p38 disminuye a las 8 y 10 horas post-infección, dato que contrasta con el mostrado en la sección VI.5, donde se muestra que la infección viral por si misma estimula los niveles de activación de p38 a las 24 horas post-infección (ver Figura 9), dato que no se observó ni con la estimulación simple con TGF- β de las células MDCK.

VII. DISCUSIÓN.

Como se mencionó en la Introducción, la inmunopatología asociada a la infección podría ser fundamental para explicar los síntomas severos provocados por la infección viral [23, 31]. En este sentido, el caracterizar el efecto de las diferentes citocinas que regulan la respuesta inflamatoria pulmonar serían de gran utilidad en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos más específicos y eficientes, no sólo en el control de los síntomas sino también para contener e inhibir la infección viral. En este sentido, y con el objetivo de iniciar la caracterización de los efectos celulares e inmunológicos inducidos por el TGF- β durante la infección con el virus influenza, en el presente trabajo, estandarizamos un sistema de infección *in vitro* en células MDCK que cumple con las características descritas en la literatura.

VII.1 Modelo de infección con virus Influenza *in vitro*.

Los resultados presentados en la primera sección de este trabajo, muestran que nuestro sistema de infección en las células MDCK por el virus Influenza A H1N1, además de ofrecer resultados reproducibles, muestra características semejantes a las descritas en la literatura especializada. Primeramente, los stock virales obtenidos fueron capaces de generar placas líticas en esta línea celular, permitiendo la determinación del título viral según las técnicas clásicas [114]. Así mismo, como resultado de la infección de las células, se generaron en el sobrenadante partículas capaces de hemaglutinar eritrocitos humanos, lo cual sugiere fuertemente que los stock virales utilizados contenían partículas víricas capaces de infectar células como se demostró en la Figura 3, mediante los ensayos en placa.

Adicionalmente, se pudo evidenciar que a partir de 10 hrs post-infección, en ensayos por Western blot, aparece una banda correspondiente a la proteína no-estructural NS1, lo cual fue confirmado por la detección positiva con un anticuerpo específico comercial; una cinética de expresión de NS1 similar fue evidenciada en otros estudios [121]. Posteriormente, ensayos con el anticuerpo monoclonal purificado y derivado de un hibridoma específico en contra de la proteína NS1, mostró una señal específica para los extractos de células MDCK infectadas con el virus (datos no mostrados). Todo esto sugiere fuertemente que nuestro modelo de infección viral coincide con la síntesis de NS1. Dado su importancia para regular la respuesta celular y, particularmente relacionada con los interferones, resultará muy interesante caracterizar su impacto sobre el sistema de regulación de los interferones de tipo I.

Finalmente, como se describió ampliamente en la sección de Introducción, la infección del virus influenza induce la muerte celular [11, 41, 45, 81, 82, 98, 122, 123]. En este estudio observamos que la incubación por al menos 24 hrs con el virus inducía la generación de células subhaploides, sugiriendo la fragmentación nuclear. Ensayos paralelos, donde se estimulaba con TGF- β , (datos no mostrados) mostraron que un efecto semejante fue observado al evaluar la permeabilidad diferencial a la molécula Yo-Pro1 (Molecular Probes, Invitrogen). Esta técnica ha sido comercialmente validada para determinar los eventos tempranos de apoptosis, mientras que la fragmentación nuclear, corresponde a eventos tardíos del mismo. En este sentido, sería interesante poder profundizar nuestro estudio de los mecanismos que llevan a la muerte celular en nuestro modelo, toda vez que algunos estudios sugieren que tanto las vías intrínsecas (caspasa 9-mitocondria) como las vías extrínsecas (FasL, caspasa 7) podrían activarse por la infección viral [40]

Por otro lado, dado que uno de nuestros objetivos consistió en caracterizar el efecto de TGF- β y su impacto en la infección por el virus influenza, se analizó y comparó la modulación de sus receptores de superficie (T β RI y T β RII) por efecto de la infección viral contra las células control. Los datos obtenidos mostraron, que aparentemente infección viral modula de forma positiva la presencia de estos receptores en la membrana celular, datos que se fortalecieron al analizar los resultados correspondientes al nivel de receptores por células (MFI). Estos resultados sugieren que la infección viral induce cambios altamente heterogéneos en el metabolismo de la célula, tanto así que a pesar de reconocerse una inhibición de la maquinaria general de síntesis de proteínas, aparentemente algunas moléculas podrían escapar a este control e incluso, podrían aumentar su expresión, tal como los receptores para el TGF- β . Alternativamente, se podría explicar el aumento en el porcentaje de células sensibles a la citocina, sugiriendo que los receptores no son sintetizados *de novo*, sino podrían resultar del reciclamiento de receptores endocitados vía caveolina [124].

En su conjunto, estos resultados muestran que bajo las condiciones aquí descritas, el virus influenza A H1N1 es capaz de inducir la infección de las células MDCK. Conviene resaltar que observamos un alto nivel de reproducibilidad en los diferentes ensayos, lo cual es un aspecto positivo para caracterizar los eventos intracelulares inducidos durante la infección viral.

VII.2 Efecto del TGF- β sobre la infección viral *in vitro*.

Previo a evaluar el posible efecto de la citocina TGF- β sobre la infección viral, fue necesario evidenciar que esta citocina era capaz de inducir sus acciones características: 1) estimulación de la muerte celular, 2) inducción de la expresión de sus receptores membranales para TGF- β (T β RI y T β RII), 3) señalización tanto por la vía canónica como por la vía alternativa.

Empleando la línea celular MDCK pudimos observar que TGF- β a una concentración de 5 ng/ml y 24 hrs de incubación, inducía muerte celular en un nivel significativo, confirmando de esta manera observaciones realizadas en varios sistemas y contextos celulares [54, 75, 77, 78, 91, 95, 125]. Así mismo, la incubación con TGF- β indujo un aumento significativo en el porcentaje de células con ambos receptores. Sin embargo, resulta interesante que de manera reproducible, los valores de MFI obtenidos fueron menores con respecto a las células control. Estos resultados muestran que al mismo tiempo, la presencia de la citocina ocasiona un aumento en el porcentaje de células T β RI⁺/T β RII⁺, estas células presentan un menor nivel de moléculas en su superficie. Estos resultados aparentemente paradójicos, podrían encontrar explicación en la regulación por endocitosis mediada por el ligando. En este sentido, se ha descrito que ambos receptores pueden ser endocitados ya sea por vesículas dependientes de clatrina o vesículas dependientes de caveolina [124]. Así mismo, se ha descrito que de esta forma, se podría promover la vía de señalización de Smad en los endosomas tempranos [124]. Es decir la endocitosis puede ser una forma de regulación positiva y no solo, una manera de que los receptores sean degradados como ya se ha reportado [50]. Estos datos resultan de gran interés en este trabajo, debido al hecho de que en las condiciones de infección viral por influenza, la respuesta a TGF- β podría variar dependiendo del nivel de receptores presente en las células blanco, no sólo en la superficie de las células sino también a su regulación a través del mecanismo de endocitosis. Toda esta información podría ser de gran relevancia para nuestro trabajo ya que sostiene el hecho de que el modelo celular MDCK es sensible tanto a la infección viral como a TGF- β , y que por tanto, podría ser un buen modelo para estudiar la interrelación entre ambos factores para regular la endocitosis y la activación de las vías de señalización por TGF- β .

Finalmente, la incubación con TGF- β de las células MDCK ocasionó que la fosforilación de la MAPK p38, mostrada en las Figura 11, se mantuviera constante. A una concentración similar, el TGF- β fue también capaz de inducir la activación de las proteínas de señalización Smads a partir de los 30 minutos. Estos datos son congruentes con los que ya han sido reportados previamente, aunque en otros tipos celulares y en otros contextos [63-66]. Asimismo,

como se describió en la Introducción, la molécula p38 es un candidato para explicar los efectos apoptóticos inducidos por el TGF- β [126]. En su conjunto, nuestros resultados mostraron que la línea MDCK es sensible al efecto del TGF- β , desde que posee los receptores membranales, provoca muerte en estas células y tanto la vía canónica (tesis de Maestría en Farmacia, Luz María C. 2007) como la vía alternativa son activadas.

Una vez que se estandarizó el sistema de infección *in vitro* y se confirmó que este tipo celular respondía a la citocina en estudio, se realizaron una serie de ensayos preliminares para evidenciar el posible efecto de la activación del TGF- β sobre la infección viral. Conviene resaltar que la posible participación de esta citocina durante la infección por el virus influenza no ha sido descrita en la literatura, hasta la fecha. En un estudio de los años 90's, se sugirió que el TGF- β puede ser directamente activado por el virus [49], por lo que podría jugar un papel importante durante esta patología. En congruencia con esta idea, el empleo de anticuerpos anti-TGF- β , demostró que era capaz de bloquear la apoptosis inducida por NA y NS1 [85]. Los pocos estudios sobre este tema, hablan de la originalidad de nuestro estudio. Así mismo, dado que el TGF- β parece jugar un papel pleiotrópico durante los procesos inflamatorios, su participación durante la infección viral, podría aportar evidencia novedosa sobre los mecanismos de regulación celular e inmunológica.

Así entonces, como se presentó en la sección de Resultados, se evaluó el efecto de la citocina sobre la batería de pruebas celulares inicialmente descritas. En un primer aspecto, en este trabajo se mostró que la estimulación previa con TGF- β incrementaba de manera estadísticamente significativa, el porcentaje de células en apoptosis a las 24 horas post-infección; resultado que no fue comparable con la simple estimulación con TGF- β . Así mismo, esta observación deberá ser evaluada modificando los parámetros de estimulación: diferente tiempo de estimulación con TGF- β o varias multiplicidades de infección, con el fin de tratar de identificar los mecanismos subyacentes. Por otro lado, datos no mostrados aquí, sugieren que la co-incubación del TGF- β con la citocina TNF- α , bloquea el efecto apoptótico. Estos resultados al parecer indican, que las vías de inducción de muerte por efecto del TGF- β [127] y la infección con el virus influenza [40] son diferentes.

Por otro lado, los niveles de los receptores para el TGF- β parecen aumentar de manera significativa por efecto de la infección viral. Sin embargo, la estimulación con el TGF- β previa a la infección viral, parece no modificar el efecto inducido por la citocina sola. Esto podría sugerir que la infección viral ocasiona el aumento de receptores de membrana por un incremento ya sea en la activación celular, por estimulación de la síntesis-secreción del TGF- β por las células infectadas o por un mecanismo que involucre el reciclamiento de los receptores. Sin embargo, a

pesar de que se realizaron varios intentos para determinar la concentración de TGF- β en el sobrenadante de cultivo, el nivel estuvo por debajo del nivel de sensibilidad del kit de ELISA (R&D). En ese sentido, debería ser fundamental en la continuación de este estudio, la determinación de la expresión (RT-PCR) o su secreción (ELISA, citometría de flujo con tinción intracelular).

Adicionalmente se mostró que los niveles de la proteína no estructural del virus influenza, (NS1), se incrementaron como consecuencia de la pre-estimulación con TGF- β . Es más, se evidenció la presencia de NS1 2 horas antes que el tiempo de aparición durante la infección viral. Este efecto podría explicarse por el hecho de que esta citocina también podría modificar los elementos de la síntesis de proteínas, tales como los factores del inicio de la traducción eIF2A y eIF3 [128]. Así mismo, este resultado podría sugerir que el TGF- β podría acelerar el ciclo replicativo del virus, aunque se requiere más evidencias para poder sugerir un mecanismo.

Un aspecto de gran interés fue la evaluación de la posible participación de las vías de señalización activadas por el TGF- β : Smads y p38. Aunque sólo se realizó un ensayo, se observó que, de forma notoria, los niveles de fosforilación de Smad 2/3 aumentaban debido a la infección viral. Asimismo, la pre-estimulación con TGF- β ocasionó que la fosforilación de estas moléculas se observara desde 2 horas antes (6 vs 8 hrs) del efecto inducido por la infección viral sola. Por el contrario, mientras la infección viral parece inducir un aumento notable de la fosforilación de p38 a las 24 hrs post-infección, la pre-incubación con el TGF- β parecía bloquear esta vía de señalización. Es más, a partir de las 10 horas post-infección, el nivel de fosforilación de esta proteína pareció disminuir. Estos datos preliminares, sugieren que la estimulación con TGF- β en la infección viral, podría modular diversos mecanismos celulares que permitan un aumento en la replicación viral o modulen la respuesta celular a favor de la infección y, finalmente, contribuyendo en la patología asociada a la infección. De acuerdo a estas observaciones, se ha reportado que algunas proteínas virales como la NS5A del virus de Hepatitis C, podrían modular las vías de señalización del TGF- β mediante su interacción con proteínas celulares, como por ejemplo, la proteína X del virus de hepatitis B, activa la vía de señalización de Smads a través de su interacción directa con Smad4 [129-131]. Por otro la proteína E1A inhibe la señalización de TGF- β a través de su unión con Smad3 [132], mientras que la proteína E7 del virus de papiloma humano inhibe la vía de señalización canónica de TGF- β al bloquear la actividad del complejo de Smad de unión al ADN [133, 134].

Todos estos resultados, en conjunto, sugieren que el virus influenza y la estimulación con TGF- β podrían regular diversos mecanismos celulares. Por un lado, el virus influenza es un

inductor de apoptosis a través de señales no conocidas totalmente, cuyo estudio puede aclarar los mecanismos de patogenia viral. Adicionalmente, la estimulación previa con TGF- β parece favorecer e incrementar esta respuesta e inducir la sobre-producción de las proteínas virales. Este resultado podría sugerir un mecanismo utilizado por el virus para favorecer su infección en la célula hospedera. Aunque son datos aún por confirmar, un primer ensayo sugiere que la infección viral induce un aumento en la fosforilación de Smad 2/3, por un lado, y aparentemente, podría cancelar la vía de p38, por otro lado. Esta sugerencia podría ser apoyada por un estudio que evidenció que el virus podría utilizar la vía de Smads para favorecer su replicación disminuyendo el metabolismo celular [93] e induciendo su apoptosis.

Finalmente, la regulación del nivel de receptores para el TGF- β podría ser un mecanismo de retroalimentación celular, donde la activación del TGF- β por efecto de la infección viral permitiría explicar el aumento de los receptores durante la infección. Esta situación ha sido observada durante otros desordenes tisulares, donde se presenta altos niveles de expresión de TGF- β [92]. De manera inherente, este hecho podría permitir un aumento de la activación de proteínas de señalización como Smads o la activación de los eventos de reciclamiento de receptores de la superficie celular.

VII. CONCLUSIONES.

- ✓ Se estandarizó un protocolo de infección *in vitro* con el virus influenza H1N1 en células MDCK, que mostró efectos característicos de esta infección viral.
- ✓ Se observó que la infección viral de las células MDCK parece inducir un aumento en la muerte celular, el nivel de expresión de los receptores para el TGF- β (T β RI y T β RII), corroborado con los valores de MFI obtenidos, y un aumento en la fosforilación de Smads 2/3 (6-10 hrs) y p38 (24 hrs).
- ✓ La incubación previa con TGF- β podría favorecer los eventos de replicación viral, evidenciado por un aumento en la síntesis de la proteína NS1.
- ✓ Se sugiere que la vía de Smads se estimula por efecto de la infección viral y TGF- β /virus, mientras que la activación de p38 parece desaparecer debido al efecto de la pre-incubación con TGF- β .

IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Garcia-Sastre, A., *Antiviral response in pandemic influenza viruses*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 44-7.
2. Drake, J.W., *Rates of spontaneous mutation among RNA viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4171-5.
3. Lynch, J.P., 3rd and E.E. Walsh, *Influenza: evolving strategies in treatment and prevention*. Semin Respir Crit Care Med, 2007. **28**(2): p. 144-58.
4. Stephenson, I., et al., *Neuraminidase inhibitor resistance after oseltamivir treatment of acute influenza A and B in children*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(4): p. 389-96.
5. Recker, M., et al., *The generation of influenza outbreaks by a network of host immune responses against a limited set of antigenic types*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7711-6.
6. Abdollah, S., et al., *TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27678-85.
7. Macias-Silva, M., et al., *MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1215-24.
8. Julkunen, I., et al., *Inflammatory responses in influenza A virus infection*. Vaccine, 2000. **19 Suppl 1**: p. S32-7.
9. Melen, K., et al., *Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5995-6006.
10. Heikkinen, L.S., et al., *Avian and 1918 Spanish influenza a virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5719-27.
11. Chen, W., et al., *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1306-12.
12. Chen, W., et al., *Mice deficient in perforin, CD4+ T cells, or CD28-mediated signaling maintain the typical immunodominance hierarchies of CD8+ T-cell responses to influenza virus*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10332-7.
13. Yewdell, J. and A. Garcia-Sastre, *Influenza virus still surprises*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(4): p. 414-8.
14. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
15. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D49-53.
16. Han, X., et al., *Interaction of mutant influenza virus hemagglutinin fusion peptides with lipid bilayers: probing the role of hydrophobic residue size in the central region of the fusion peptide*. Biochemistry, 1999. **38**(45): p. 15052-9.
17. Steinhauer, D.A., *Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus*. Virology, 1999. **258**(1): p. 1-20.
18. Cros, J.F. and P. Palese, *Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses*. Virus Res, 2003. **95**(1-2): p. 3-12.
19. Kash, J.C., et al., *Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection*. Virus Res, 2006. **119**(1): p. 111-20.
20. Kochs, G., A. Garcia-Sastre, and L. Martinez-Sobrido, *Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7011-21.

21. Garcia-Sastre, A., et al., *Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems*. *Virology*, 1998. **252**(2): p. 324-30.
22. Garcia-Sastre, A., *Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses*. *Virology*, 2001. **279**(2): p. 375-84.
23. Cheung, C.Y., et al., *Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?* *Lancet*, 2002. **360**(9348): p. 1831-7.
24. Wagner, R., M. Matrosovich, and H.D. Klenk, *Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections*. *Rev Med Virol*, 2002. **12**(3): p. 159-66.
25. Klenk, H.D., et al., *Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus*. *Virus Res*, 2002. **82**(1-2): p. 73-5.
26. Hilleman, M.R., *Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control*. *Vaccine*, 2002. **20**(25-26): p. 3068-87.
27. Epstein, S.L., *Control of influenza virus infection by immunity to conserved viral features*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2003. **1**(4): p. 627-38.
28. Tumpey, T.M., et al., *Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus*. *Science*, 2005. **310**(5745): p. 77-80.
29. Tumpey, T.M., et al., *Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice*. *J Virol*, 2005. **79**(23): p. 14933-44.
30. Gentile, D., et al., *Increased interleukin-6 levels in nasal lavage samples following experimental influenza A virus infection*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998. **5**(5): p. 604-8.
31. Hayden, F.G., et al., *Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(3): p. 643-9.
32. Kash, J.C., et al., *Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus*. *Nature*, 2006. **443**(7111): p. 578-81.
33. Beigel, J. and M. Bray, *Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza*. *Antiviral Res*, 2008. **78**(1): p. 91-102.
34. Poland, G.A., R.M. Jacobson, and I.G. Ovsyannikova, *Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use*. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(9): p. 1254-6.
35. Wang, N.X. and J.J. Zheng, *Computational studies of H5N1 influenza virus resistance to oseltamivir*. *Protein Sci*, 2009. **18**(4): p. 707-15.
36. Fleming, D.M., et al., *Influenza virus resistance to oseltamivir: what are the implications?* *Eur J Public Health*, 2009. **19**(3): p. 238-9.
37. Gulati, S., D.F. Smith, and G.M. Air, *Deletions of neuraminidase and resistance to oseltamivir may be a consequence of restricted receptor specificity in recent H3N2 influenza viruses*. *Virol J*, 2009. **6**: p. 22.
38. Abed, Y., M. Baz, and G. Boivin, *A novel neuraminidase deletion mutation conferring resistance to oseltamivir in clinical influenza A/H3N2 virus*. *J Infect Dis*, 2009. **199**(2): p. 180-3.
39. Salomon, R. and R.G. Webster, *The influenza virus enigma*. *Cell*, 2009. **136**(3): p. 402-10.
40. Lowy, R.J., *Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms*. *Int Rev Immunol*, 2003. **22**(5-6): p. 425-49.
41. Julkunen, I., et al., *Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001. **12**(2-3): p. 171-80.

42. Garcia-Sastre, A., et al., *The role of interferon in influenza virus tissue tropism*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8550-8.
43. Turpin, E., et al., *Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8802-11.
44. Garcia-Sastre, A., *Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **283**: p. 249-80.
45. Mori, I., et al., *In vivo induction of apoptosis by influenza virus*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 11): p. 2869-73.
46. Mori, I., et al., *Viremia induced by influenza virus*. Microb Pathog, 1995. **19**(4): p. 237-44.
47. Peper, R.L. and H. Van Campen, *Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in influenza A viral pneumonia*. Microb Pathog, 1995. **19**(3): p. 175-83.
48. Hussell, T., A. Pennycook, and P.J. Openshaw, *Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology*. Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2566-73.
49. Schultz-Cherry, S. and V.S. Hinshaw, *Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8624-9.
50. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
51. Ulloa, L., J. Doody, and J. Massague, *Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway*. Nature, 1999. **397**(6721): p. 710-3.
52. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1499-505.
53. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta in T-cell biology*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 46-53.
54. Wahl, S.M., et al., *TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 15-24.
55. Wahl, S.M., J. Wen, and N. Moutsopoulos, *TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege*. Immunol Rev, 2006. **213**: p. 213-27.
56. Massague, J., *How cells read TGF-beta signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 169-78.
57. Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.
58. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. EMBO J, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
59. Kim, E.S., M.S. Kim, and A. Moon, *Transforming growth factor (TGF)-beta in conjunction with H-ras activation promotes malignant progression of MCF10A breast epithelial cells*. Cytokine, 2005. **29**(2): p. 84-91.
60. Schultz-Cherry, S. and J.E. Murphy-Ullrich, *Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism*. J Cell Biol, 1993. **122**(4): p. 923-32.
61. Dubois, C.M., et al., *Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10618-24.
62. ten Dijke, P. and C.S. Hill, *New insights into TGF-beta-Smad signalling*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 265-73.
63. Pasche, B., et al., *TbetaR-I(6A) is a candidate tumor susceptibility allele*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5678-82.

64. Biswas, S., et al., *Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(14): p. 4687-92.
65. Huntley, S.P., et al., *Attenuated type II TGF-beta receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination*. *Int J Cancer*, 2004. **110**(2): p. 170-6.
66. Mizuguchi, T., et al., *Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome*. *Nat Genet*, 2004. **36**(8): p. 855-60.
67. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. *Nature*, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
68. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 685-700.
69. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-beta superfamily*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.
70. Nakao, A., *Is TGF-beta1 the key to suppression of human asthma?* *Trends Immunol*, 2001. **22**(3): p. 115-8.
71. Williams, A.E., et al., *TGF-beta prevents eosinophilic lung disease but impairs pathogen clearance*. *Microbes Infect*, 2005. **7**(3): p. 365-74.
72. Williams, B.G., et al., *Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections*. *Lancet Infect Dis*, 2002. **2**(1): p. 25-32.
73. Wahl, S.M., *Transforming growth factor-beta: innately bipolar*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(1): p. 55-62.
74. Chang, C.J., et al., *Transforming growth factor-beta induces apoptosis in antigen-specific CD4+ T cells prepared for adoptive immunotherapy*. *Immunol Lett*, 2003. **86**(1): p. 37-43.
75. Clancy, R.M. and J.P. Buyon, *Clearance of apoptotic cells: TGF-beta in the balance between inflammation and fibrosis*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(6): p. 959-60.
76. Yoo, J., et al., *Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 43001-7.
77. Kim, S.G., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(2): p. 420-34.
78. Sakuraba, H., et al., *Transforming growth factor-{beta} regulates susceptibility of epithelial apoptosis in murine model of colitis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1029**: p. 382-4.
79. Price, G.E., H. Smith, and C. Sweet, *Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence*. *J Gen Virol*, 1997. **78** (Pt 11): p. 2821-9.
80. Nichols, J.E., J.A. Niles, and N.J. Roberts, Jr., *Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus*. *J Virol*, 2001. **75**(13): p. 5921-9.
81. Colamussi, M.L., et al., *Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria*. *Blood*, 1999. **93**(7): p. 2395-403.
82. Schultz-Cherry, S., et al., *Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells*. *J Virol*, 2001. **75**(17): p. 7875-81.
83. Ohyama, K., et al., *Apoptosis induced by influenza virus-hemagglutinin stimulation may be related to fluctuation of cellular oxidative condition*. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26**(2): p. 141-7.
84. Morris, S.J., et al., *Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis*. *J Gen Virol*, 1999. **80** (Pt 1): p. 137-46.
85. Morris, S.J., H. Smith, and C. Sweet, *Exploitation of the Herpes simplex virus translocating protein VP22 to carry influenza virus proteins into cells for studies of*

- apoptosis: direct confirmation that neuraminidase induces apoptosis and indications that other proteins may have a role. *Arch Virol*, 2002. **147**(5): p. 961-79.
86. La Gruta, N.L., et al., *A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(2): p. 85-92.
 87. Topham, D.J., R.A. Tripp, and P.C. Doherty, *CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes*. *J Immunol*, 1997. **159**(11): p. 5197-200.
 88. Doherty, P.C., et al., *Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections*. *Immunol Rev*, 1997. **159**: p. 105-17.
 89. Hsieh, S.M. and S.C. Chang, *Insufficient perforin expression in CD8+ T cells in response to hemagglutinin from avian influenza (H5N1) virus*. *J Immunol*, 2006. **176**(8): p. 4530-3.
 90. Bosse, Y. and M. Rola-Pleszczynski, *Controversy surrounding the increased expression of TGF beta 1 in asthma*. *Respir Res*, 2007. **8**: p. 66.
 91. Makinde, T., R.F. Murphy, and D.K. Agrawal, *The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(5): p. 348-56.
 92. Torrego, A., et al., *Expression and activation of TGF-beta isoforms in acute allergen-induced remodelling in asthma*. *Thorax*, 2007. **62**(4): p. 307-13.
 93. 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.
 94. Lee, D.C., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1*. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10147-54.
 95. Yu, L., M.C. Hebert, and Y.E. Zhang, *TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses*. *EMBO J*, 2002. **21**(14): p. 3749-59.
 96. Mulder, K.M., *Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. **11**(1-2): p. 23-35.
 97. Pleschka, S., et al., *Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(3): p. 301-5.
 98. Brydon, E.W., S.J. Morris, and C. Sweet, *Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity*. *FEMS Microbiol Rev*, 2005. **29**(4): p. 837-50.
 99. Akaike, T., *Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation*. *Rev Med Virol*, 2001. **11**(2): p. 87-101.
 100. Xiao, Y.Q., et al., *Oxidants selectively reverse TGF-beta suppression of proinflammatory mediator production*. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 1209-17.
 101. Baumgarth, N., et al., *Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2250-5.
 102. Lamm, M.E., et al., *IgA and mucosal defense*. *APMIS*, 1995. **103**(4): p. 241-6.
 103. Mazanec, M.B., C.L. Coudret, and D.R. Fletcher, *Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies*. *J Virol*, 1995. **69**(2): p. 1339-43.
 104. Mazanec, M.B., et al., *Intracellular neutralization of Sendai and influenza viruses by IgA monoclonal antibodies*. *Adv Exp Med Biol*, 1995. **371A**: p. 651-4.
 105. Lamm, M.E., et al., *New functions for mucosal IgA*. *Adv Exp Med Biol*, 1995. **371A**: p. 647-50.
 106. Karagiannidis, C., et al., *Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(1): p. 111-8.
 107. Mozdzanowska, K., et al., *CD4+ T cells are ineffective in clearing a pulmonary infection with influenza type A virus in the absence of B cells*. *Virology*, 1997. **239**(1): p. 217-25.

108. Mozdzanowska, K., et al., *A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4347-55.
109. Taylor, P.M., F. Esquivel, and B.A. Askonas, *Murine CD4+ T cell clones vary in function in vitro and in influenza infection in vivo*. Int Immunol, 1990. **2**(4): p. 323-8.
110. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
111. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
112. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
113. Veldhoen, M. and B. Stockinger, *TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 358-61.
114. Mahy Brian WJ, K.H.O., *Virology Methods Manual*. 1995, San Diego, CA: Academic Press. 374.
115. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
116. Uiprasertkul, M., et al., *Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(5): p. 708-12.
117. Sorrentino, A., et al., *The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1199-207.
118. Ye, L., H. Kynaston, and W.G. Jiang, *Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway*. J Urol, 2009. **181**(6): p. 2749-59.
119. Yeh, W.L., et al., *Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production*. Glia, 2009. **57**(4): p. 454-64.
120. Hayashi, S., et al., *Analysis of gene expression in human bronchial epithelial cells upon influenza virus infection and regulation by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-N-terminal kinase*. Respirology, 2008. **13**(2): p. 203-14.
121. Ehrhardt, C., et al., *Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence*. Cell Microbiol, 2006. **8**(8): p. 1336-48.
122. Takizawa, T., et al., *Activation of the apoptotic Fas antigen-encoding gene upon influenza virus infection involving spontaneously produced beta-interferon*. Virology, 1995. **209**(2): p. 288-96.
123. Wurzer, W.J., et al., *Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2717-28.
124. Chen, Y.G., *Endocytic regulation of TGF-beta signaling*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 58-70.
125. Rahimi, R.A. and E.B. Leof, *TGF-beta signaling: a tale of two responses*. J Cell Biochem, 2007. **102**(3): p. 593-608.
126. Pelala, G., et al., *Effects of transforming growth factor-[beta] and budesonide on mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis in airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(1): p. 12-8.
127. Zhou, J., et al., *Functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand production by avian influenza virus-infected macrophages*. J Infect Dis, 2006. **193**(7): p. 945-53.
128. McGonigle, S., M.J. Beall, and E.J. Pearce, *Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF beta response*. Biochemistry, 2002. **41**(2): p. 579-87.

129. Qing, J., et al., *Transforming growth factor beta/Smad3 signaling regulates IRF-7 function and transcriptional activation of the beta interferon promoter*. Mol Cell Biol, 2004. 24(3): p. 1411-25.
130. Lee, M.N., et al., *Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway*. J Gen Virol, 2002. 83(Pt 9): p. 2145-51.
131. Lee, D.K., et al., *The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis*. Genes Dev, 2001. 15(4): p. 455-66.
132. Lee, H.J., et al., *A novel E1A-like inhibitor of differentiation (EID) family member, EID-2, suppresses transforming growth factor (TGF)-beta signaling by blocking TGF-beta-induced formation of Smad3-Smad4 complexes*. J Biol Chem, 2004. 279(4): p. 2666-72.
133. Lee, D.K., et al., *The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence*. J Biol Chem, 2002. 277(41): p. 38557-64.
134. Prokova, V., G. Mosialos, and D. Kardassis, *Inhibition of transforming growth factor beta signaling and Smad-dependent activation of transcription by the Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr virus*. J Biol Chem, 2002. 277(11): p. 9342-50.