



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“Mecanismos de inflamación y coagulación en la patogenia del virus de  
influenza A”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL PRESENTA:**

**Biol. Exp. Héctor Guillermo Cordero García**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Director interno.  
Dr. José Luis Eduardo Flores Sáenz.**

**Director externo.  
Dr. Carlos Cabello Gutiérrez.**

**Asesor externo.  
M en C. Fernando Hernández Sánchez.**

**12 de diciembre de 2016**

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada al alumno Héctor Guillermo Cordero García con el Número de Becario 299070

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada “**Mecanismos de inflamación y coagulación en la patogenia del virus de influenza A**”, que presentó el Lic. en Biología Experimental Héctor Guillermo Cordero García el día 12 de diciembre de 2016.

### Presidente

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.  
Profesor titular C.  
Depto. Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
jcap@xanum.uam.mx



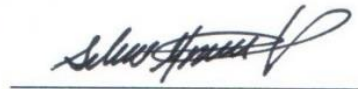
### Secretario

M. en C. Fernando Hernández Sánchez.  
Investigador Titular B  
Investigador en Ciencias Médicas B.  
Laboratorio de Virología y Micología.  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
“Ismael Cosío Villegas”  
fherndezsnchez@gmail.com.mx



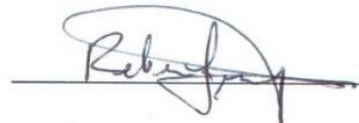
### Vocal 1

Dra. Silvia Guzmán Beltrán  
Investigadora en Ciencias Médicas D.  
Departamento de Investigación Microbiología.  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
“Ismael Cosío Villegas”  
guzman.silvia@gmail.com



### Vocal 2

Dra. Rebeca López Marure  
Investigadora en Ciencias Médicas D.  
Departamento de Fisiología.  
Instituto nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”  
rlmarure@yahoo.com.mx



**COMITÉ TUTORAL**

**Director interno: Dr. José Luis Eduardo Flores Sáenz**

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Departamento de Ciencias de la Salud área Farmacología

Correo electrónico: csib@xanum.uam.mx

**Director externo: Dr. Carlos Cabello Gutiérrez**

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas

Investigador en Ciencias Médicas

Laboratorio de Virología y Micología

Correo electrónico: carloscg@gmail.com

**Asesor: M en C. Fernando Hernández Sánchez**

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas

Investigador en Ciencias Médicas

Laboratorio de Virología y Micología

Correo electrónico: fherndezsanchez@gmail.com

**DEDICATORIA**

***Mi madre:  
que siempre ha sido un ejemplo a seguir con su fuerza , amor y  
valentía que siempre demuestra.***

***A mis hermanas Pamela y Ximena:  
Las cuales nunca me han dejado solo y nunca han dejado de  
alentarme a pesar de ser un hermano muy complicado.***

***A mi hermano: Demian, el cual ha creído en mí y también ama este  
maravilloso mundo de la ciencia.***

***Mis amigos-hermanos: David, Alberto, Adrian, que nuestra amistad  
resuena en eternidad.***

**AGRADECIMIENTOS**

A Dr. Carlos Cabello Gutiérrez: Por darme la oportunidad de estar en su equipo de trabajo, instruirme tenerme paciencia y constantemente apoyarme en todos mis tropiezos, y en especial por ser más que un tutor, ser un gran amigo.

A M en C. Fernando Hernández Sánchez: Por ser un pilar fundamental en este trabajo, y para todo el equipo del departamento, ayudarme día a día, y siempre alentarme a lograr los objetivos propuestos. Además por su increíble pasión hacia la ciencia la que contagia a todo el que lo rodea.

A mis compañeros del laboratorio, Pedro y Luis con los que he crecido en este proceso de aprendizaje, y me ayudaron en toda la realización de este trabajo.

A Dr. José Luis Eduardo Flores Sáenz, por su amistad, consejos y apoyo, además por ser un gran profesor, que me alentó en este camino de la biología experimental.

A M. en C. José Luis Ventura Gallegos del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su invaluable apoyo en la realización de los ensayos de retardo en la movilidad electroforética reportados en ésta tesis.

A la Dra. Silvia Guzmán Beltrán y Dra. Rebeca López Marure, por sus valiosas observaciones en la tesis.

Así como al Dr. Julio Cesar Almanza Pérez, por su apoyo en todo el posgrado y sus observaciones constantes en mi proceso de aprendizaje.

A todos los miembros del laboratorio de Virología y Micología del INER, por apoyarme y compartir muchos buenos momentos.

A mis amigos que de alguna forma me apoyaron durante este tiempo Claudia, Wendy, Bety, Joel, Gaby, Manu, Adriana, Toño, Juan toño, por estos años de amistad.

A Bea, por estar conmigo, por apoyarme darme la oportunidad de conocerme y aguantarme en este proceso.

## **ABREVIATURAS**

- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNc: Ácido ribonucleico complementario
- ARNs: Ácido ribonucleico pequeños
- ARNv: Ácido ribonucleico viral
- $Ca^{+2}$ : Calcio
- CID: Coagulación intravascular diseminada
- FIIa: Trombina
- FT: Factor tisular
- FTs: Factor tisular soluble
- HA: Hemaglutinina
- ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular
- IL-6: Interleucina 6
- IL-8: Interleucina 8
- IV: Influenza virus
- IVA: Influenza virus A



- M1: proteína de matriz 1
- M2: proteína de canal iónico
- MCP-1: Proteína quimio atrayente de monocitos
- MIP-1a: Proteína inflamatoria de macrófagos a
- MIP-1b: Proteína inflamatoria de macrófagos b
- NA: Neuraminidasa
- NEP: proteína de exportación nuclear
- NP: Núcleo proteína
- NS1: Proteína no estructural 1
- P.I. : Post-infección
- PAR: Receptores activados por proteasas
- RNP: Ribonucleoproteínas
- AS: Ácido siálico
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

## **RESUMEN**

El virus de influenza H1N1 (2009), es considerado una emergencia sanitaria a nivel mundial; se ha descrito que durante el 2009 ocasionó 151,700 a 575,400 en todo el

mundo afectando mayoritariamente a personas menores de 65 años. El virus de Influenza comúnmente infecta el tracto superior respiratorio resultando en una infección limitada, sin embargo en casos severos puede llegar al aparato respiratorio bajo, y ocasionar neumonía. Este proceso genera daño severo a la microvasculatura pulmonar, el daño a endotelio da inicio a la cascada de coagulación por la exposición del factor tisular (FT), causando edema, hipoxemia y falla respiratoria. Así mismo en pacientes con influenza severa, se ha descrito la presencia de tormenta de citocinas en casos fatales, y falla multiorgánica. En estos procesos inflamatorios los receptores activados por proteasas (PAR's), juegan un papel determinante, debido a que su actividad está directamente relacionada con procesos involucrados en, citoprotección, regulación de la cascada de coagulación e inflamación. PAR-1 es un receptor presente en la microvasculatura del endotelio y su participación en la activación de genes inflamatorios a través de proteínas G, es determinante para la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, que regula la expresión de dichos genes.

## **ABSTRACT**

Influenza A virus H1N1 (2009) is considered a global health emergency; it has been described that during 2009 caused between 151,700 and 575,400 deaths worldwide, affecting mostly people under 65 years. Influenza viruses commonly infect the upper respiratory tract resulting in a limited infection, but in severe cases the viruses can reach the lower respiratory tract and cause pneumonia. In this type of infections a severe damage is generated in the pulmonary microvasculature, damaged endothelium initiates the blood coagulation by the exposure of tissue factor (TF), causing edema, hypoxemia and respiratory failure. Also in patients with severe influenza, it has been described an increase in proinflammatory cytokines denominated “cytokine storm” causing fatal cases, and multiorgan failure. In these inflammatory processes protease activated receptors (PARs), play a determinant role because its activity is directly involved in cytoprotection, regulation of the coagulation cascade and inflammatory processes. PAR-1 is a receptor present in the microvasculature endothelium and its participation in the activation of inflammatory genes through G proteins, is decisive for the translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus, which regulates the expression of such genes. Currently there is not clear information on the participation of PAR-1 during infection of the vascular endothelium with influenza A virus.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Antecedentes históricos del virus de influenza A .....	1
Características generales del virus de Influenza .....	5
Patogénesis viral .....	9
Respuesta inflamatoria .....	10
Procesos de coagulación .....	11
Endotelio y proteínas involucradas en el sistema hemostático.....	12
ANTECEDENTES .....	15
Daño a endotelio por otros virus .....	15
Reportes de problemas trombo vasculares asociados al virus de influenza.....	16
JUSTIFICACIÓN .....	18
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	18
OBJETIVOS PARTICULARES .....	19
MÉTODOS .....	20
Cultivo celular .....	20
Propagación del virus de influenza A H1N1.....	20
Ensayo de Hemaglutinación .....	21
Cinéticas de infección.....	21

Extracción de ARN .....	22
RT-PCR .....	23
qPCR .....	24
Electroforesis.....	24
Inmunoanálisis (“Western blot”).....	25
Inmucitoquímica (ICQ).....	25
Detección de concentraciones de citocinas.....	26
Análisis estadístico .....	27
RESULTADOS:.....	28
El virus de influenza A sí infecta a las células endoteliales HMEC-1.....	28
El Factor Tisular no presenta cambios en presencia de influenza.....	31
Influenza virus A H1N1 no induce la translocación de NF- $\kappa$ B pero encienden una vía de MAPK cinasas.....	35
Influenza virus A H1N1 promueve el aumento de PAR-1 en células HMEC-1. .	38
Translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo por TNF- $\alpha$ y trombina. La trombina, genera la degradación de PAR- 1.....	41
Producción de citocinas inflamatorias.....	47
DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55

## **INTRODUCCIÓN**

### **Antecedentes históricos del virus de influenza A**

El ser humano se enfrenta constantemente a enfermedades ocasionadas por deficiencias genéticas, mala alimentación, o simplemente por excesos en nuestra vida cotidiana. Sin embargo los microorganismos patógenos a los que estamos expuestos constantemente presentan un problema de salud grave al que la humanidad se ha expuesto a lo largo de su historia, ya que han causado millones de muertes. Algunos de estos patógenos son los virus, los cuales son considerados como parásitos intracelulares obligados ya que requieren de otros organismos para poder generar su progenie viral, y al mismo tiempo pueden ocasionar intercambios genéticos que generan mutaciones que favorecen el traspaso de la barrera inter-específica. El virus de influenza es un ejemplo claro de esos mecanismos de cruce de barrera inter-específica, ya que su reservorio natural son las aves acuáticas, sin embargo la adquisición de aves para domesticación ocasionó una constante relación entre las aves (ahora llamadas de corral) y los humanos, incrementando el contacto entre aves y humanos, y consecuentemente también el intercambio de agentes infecciosos. El virus de influenza (IV) tiene la capacidad de infectar a cánidos, equinos, y porcinos (Joseph, Su et al. 2016) (Figura 1). En algunas infecciones zoonóticas el patógeno

puede adaptarse a otras especies de animales incluyendo a los humanos, y esporádicamente llegan a ser infecciones con alto grado de mortalidad aún sin haberse adaptado al humano (Medina and Garcia-Sastre 2011). Otras infecciones zoonóticas pueden estabilizarse y adaptarse a los humanos, esto lleva a que se mantenga la transmisión circulante de persona a persona (por ejemplo VIH, SARS)(Taubenberger and Kash 2010). Claramente el virus de influenza cae en la categoría de la adaptación y transmisión de persona a persona, los mecanismos por los cuales estos virus se estabilizan y adaptan a nuevas especies aún no están del todo establecidos (Holmes, Ghedin et al. 2005).

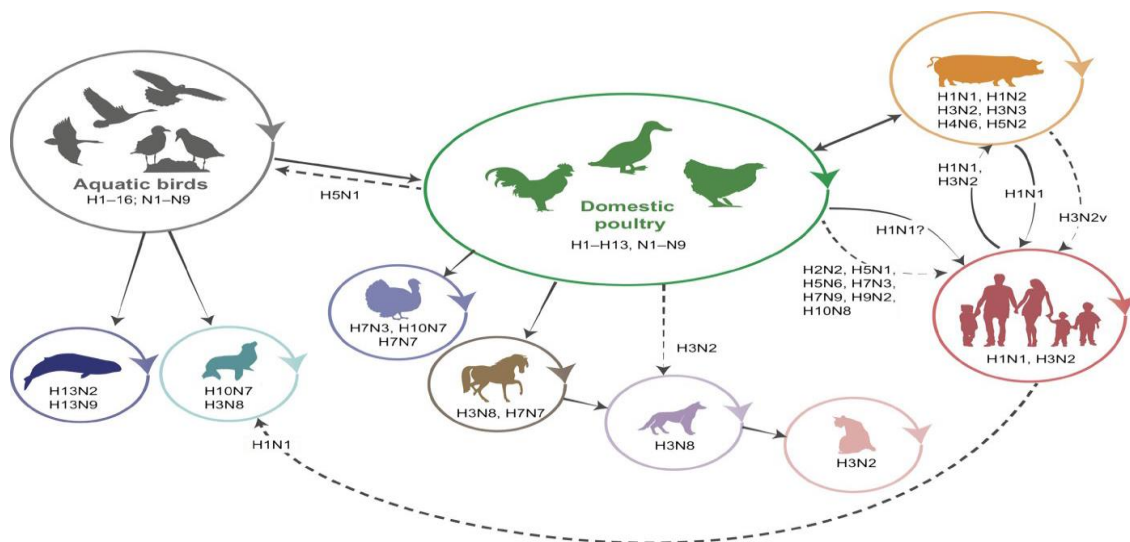


Figura 1) Especies importantes capaces de transmitir virus de influenza A (VIA). Diagrama representativo de los eventos de transmisión inter-especie de los VIA's y los subtipos involucrados en estos eventos. Las flechas continuas representan una transmisión directa, los virus que ya se han establecido en el huésped. Las flechas punteadas indican infección limitada o esporádica donde los subtipos de VIA's en nuevos huéspedes donde no se han mantenido los virus (Joseph, Su et al. 2016).

Aproximadamente hace dos siglos las infecciones solo podían ser identificadas por los signos y síntomas que causaba la enfermedad, lo que resultaba altamente inespecífico ya que muchos virus respiratorios generan síntomas similares como un aumento repentino de temperatura corporal, junto con dolor muscular. En 1932, el virus de influenza fue aislado e identificado por primera vez, de esta manera se ha logrado seguir la pista de lo acontecido en años anteriores (Potter 2001). Se estima que han ocurrido 14 pandemias por virus de influenza A desde el año 1500 (Runstadler, Hill et al. 2013, Joseph, Linster et al. 2015). En los últimos 120 años se han reportado diferentes pandemias en: 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 y 2009, (Figura 2) (Taubenberger and Morens 2009) De 1957 a 1968 las pandemias han causado aproximadamente entre 70,000 y 340,000 muertes tan solo en los Estados Unidos.

Una de las epidemias más catastróficas causadas por el virus de influenza A fue “la gripe española” entre agosto de 1918 y marzo de 1919 se esparció alrededor del mundo, causando al menos la muerte de 30 a 50 millones de personas (CROSBY 2003). El subtipo identificado fue H1N1, el cual se mantuvo en circulación de 1918 a 1957. Las pandemias de influenza virus A (VIA) ocurren en un área geográfica específica, y se esparcen a través del mundo infectando a millones de personas (Potter 2001). El último brote reportado ocurrió en el 2009, la cepa asociada con esta pandemia sufrió la adquisición de un nuevo subtipo de hemaglutinina y un nuevo subtipo de neuraminidasa, frente a los cuales los humanos no teníamos inmunidad (Robertson and Inglis 2011). Dicho brote fue el primer evento pandémico reportado en el siglo XXI y fue causado por esta nueva cepa de VIA (H1N1), el lugar de su origen



fue en México en los meses de febrero y marzo del 2009 (Fineberg 2014). El origen de este virus fue porcino, el cual fue un ejemplo del traspaso de la barrera inter-específica, y consistió en un triple reordenamiento de segmentos de genes que nunca había sido reportado en virus porcinos o virus humanos. Se ha estimado que las muertes reportadas alrededor del mundo en el primer año por VIA pandémica H1N1 van de 151, 700 a 575, 400 (Dawood, Iuliano et al. 2012). Estos eventos mencionados posicionan al VIA como un problema de salud a nivel mundial, y debido a esto es imperativo el incrementar el conocimiento acerca del virus.

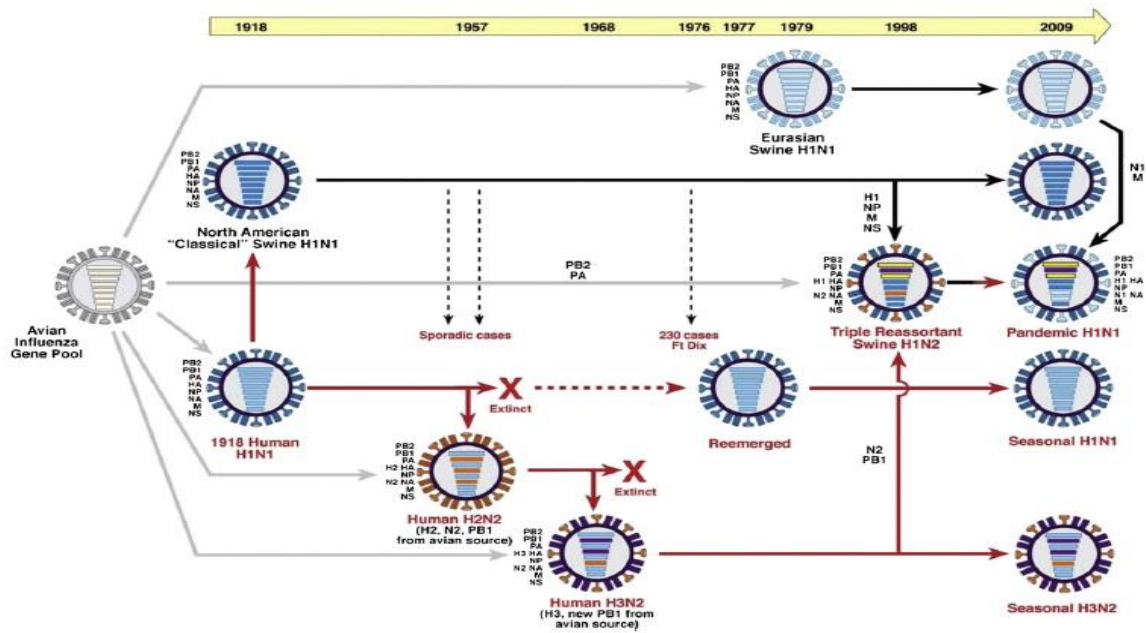


Figura 2) Relación genética entre humanos y VIA porcina relevantes, 1918-2009. Las flechas grises indican 1 o más segmentos provenientes del virus de influenza aviar, a pesar de que el tiempo y mecanismo en cada caso es desconocido. La línea punteada indica el periodo sin circular del virus de H1N1 en humanos. Las flechas solidas rojas indican el linaje de VIA's en la evolución de patógenos en humanos; las flechas negras solidas son los linajes porcinos; y las flechas negras a rojo son del origen porcino al virus de influenza pandémico 2009 humano. Las líneas punteadas negras son las infecciones zoonóticas humanas del virus porcino (Taubenberger and Kash 2010)

## Características generales del virus de Influenza

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, la cual comprende 5 géneros, *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus* (Lamb RA 2001). Los VIA son virus envueltos y esta envoltura es derivada de la membrana lipídica del huésped que han infectado (Medina and Garcia-Sastre 2011). La clasificación de los virus se basa en las propiedades antigénicas de las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) que se ubican en la membrana de la envoltura viral. La HA juega un papel importante en la determinación del tropismo del huésped, y en la fase inicial del ciclo de replicación, ya que se une a los receptores del epitelio superior respiratorio que tienen una terminación  $\alpha$ -2,6 del ácido siálico (AS) y de esta manera da inicio al ciclo de infección viral. Por otra parte la NA tiene una actividad crucial en la fase final del ciclo, ya que corta al receptor de AS del huésped permitiendo un encapsulamiento adecuado y la liberación efectiva de la progenie viral (Nobusawa, Aoyama et al. 1991, Russell, Gamblin et al. 2004, Fouchier, Munster et al. 2005) . El genoma del virus consiste en 8 segmentos de ARN de una sola cadena en sentido negativo, que codifican para 12 proteínas, estas son: 1) la hemaglutinina (HA), 2) la Neuraminidasa, (NA), 3) la proteína de matriz M1 de la nucleocápside, 4) la proteína de canal iónico M2 que es una proteína integral de membrana, 5) la proteína de exportación nuclear, (NEP), 6) la proteína 1 no estructural antagonista de respuesta antiviral al huésped (NS1) codificada por el segmento NS, 7) la nucleoproteína (NP), y

los componentes de ARN dependientes del complejo de ARN polimerasa: 8) PB1, 9) PB2, 10) PA, 11) la proteína N40, (proteína identificada recientemente), 12) la proteína PB1-F2, que es codificada por un segundo ORF en el segmento de PB1.

Dentro de la envoltura cada uno de los ocho segmentos virales forman un complejo de ribonucleoproteínas (RNP): donde el ARN viral esta enrollado alrededor de la NP, y forman una estructura con el complejo de la polimerasa viral (Wise, Foeglein et al. 2009) (Figura 3).

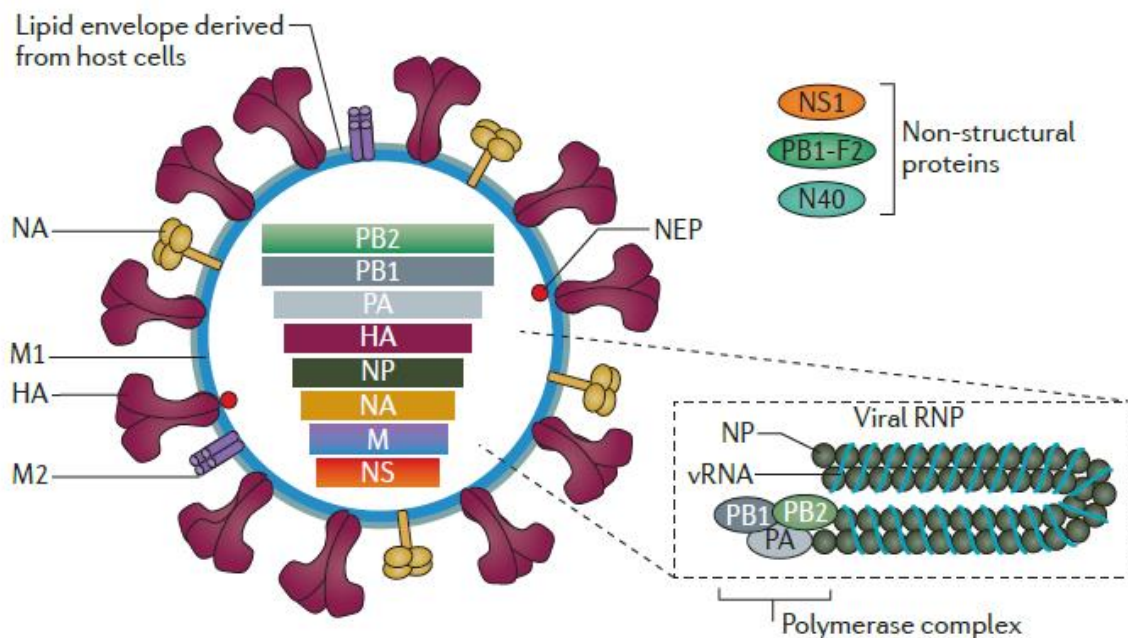


Figura 3) Estructura del virus de influenza. Se muestra un esquema de la estructura del virus señalando la envoltura lipídica proveniente del huésped; las proteínas estructurales NA, NEP, M1, A, M2. Al interior del virus los 8 segmentos de genes; PB2, PB1; PA, HA, NP, NA, M, NS Y encerrado en líneas punteadas el acomodo del ARN viral de cada uno de los segmentos enrollado en la proteína NP (RNP viral), que están unidos cada uno de estos segmentos al complejo viral de polimerasas. NS1, PB1-F2, N40 son proteínas no estructurales dl virus (Medina and Garcia-Sastre 2011).

El ciclo de replicación de la influenza inicia cuando la HA viral se une a los receptores del huésped que contienen residuos terminales de unión al AS ( $\alpha$ -2,6 o  $\alpha$ -2,3), como condición previa a la interacción virus-célula, se requiere del procesamiento proteolítico de la HA por proteasas extra celulares, esto es debido a que la región de la HA responsable de la fusión entre la envoltura viral y la membrana debe ser expuesta. Los virus entran a la célula por endocitosis mediada por receptores. Una vez formado el endosoma, el endosoma se acerca al núcleo de la célula infectada y ocurre una acidificación que abre por la proteína de canal iónico viral M2 ocasionando también una acidificación al interior de la envoltura del virión, este proceso es requerido para desintegrar la envoltura y tener una adecuada exposición de los complejos RNP, los cuales contienen al genoma viral, la acidificación del endosoma propicia la liberación de los complejos de RNP. Durante este proceso el endosoma se aproxima al núcleo y ocurre la translocación de los complejos de RNP. Ya en el interior del núcleo el ARN viral de sentido negativo (ARNv) es transcrito y replicado por la ARN-polimerasa dependiente de ARN, dando lugar a tres tipos diferentes de moléculas de ARN: el ARN de sentido positivo que es complementario al ARNv ((+)ARNc), el cual es usado como templado para generar más ARNv; ARNs pequeños virales de sentido negativo que posiblemente regulan el paso de la transcripción a la replicación; y finalmente los ARNs mensajeros virales que son exportados al citoplasma y usados en la síntesis de proteínas. Las proteínas virales sintetizadas HA, NA y M2 son transportadas por la vía secretora *trans*-Golgi y las proteínas maduras llegan a la

membrana plasmática, donde la proteína M1 colabora en la formación de las partículas virales. Posteriormente se forma un “brote” (budding) que da paso a la liberación de las partículas virales de las células hospedero que es mediada por la actividad de la NA, que degrada al AS celular de las glicoproteínas celulares que de otro modo mantendría retenidos a el virión en la superficie (Figura 4) (Perez, Varble et al. 2010, Umbach, Yen et al. 2010).

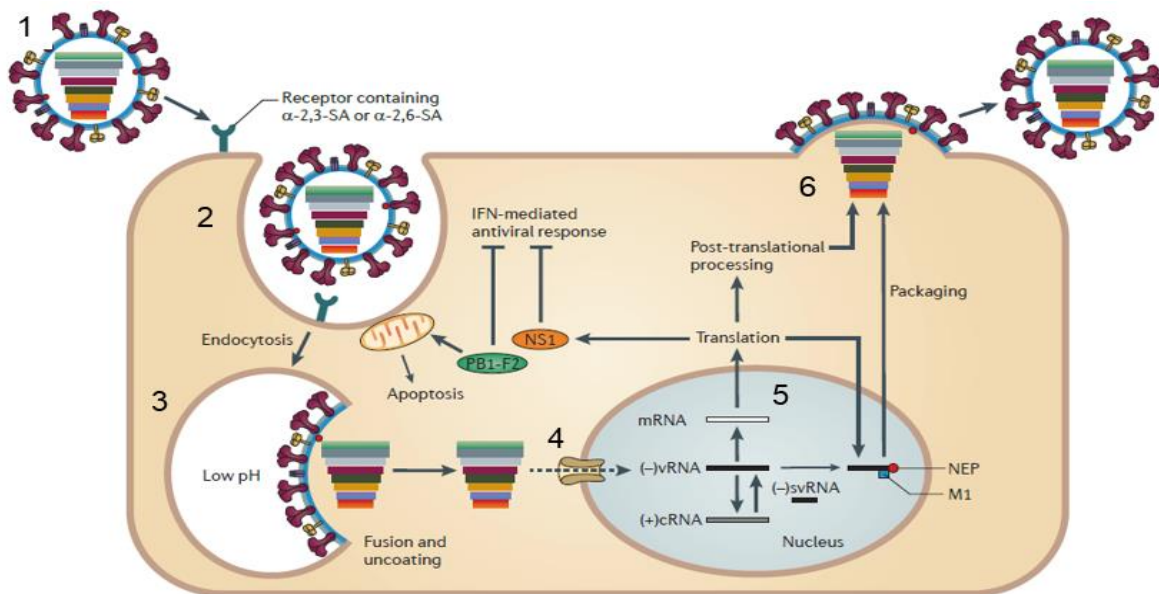


Figura 4) Ciclo de replicación del virus de influenza. 1) reconocimiento de los receptores de ácido siálico del huésped. 2) formación del endosoma. 3) Liberación de los segmentos de ARNv. 4) Ingreso al núcleo de los segmentos de ARNv y transcripción de los segmentos. 5) traducción de proteínas y transporte a la membrana plasmática del huésped, tanto de las proteínas estructurales como de los segmentos del RNAv. 6) liberación de las nuevas partículas virales (Medina and Garcia-Sastre 2011).

## **Patogénesis viral**

La influenza es una enfermedad de gran complejidad en la cual el desarrollo de síntomas y el desenlace de la enfermedad dependen de las interacciones que se dan entre un virus siempre cambiante, y los diferentes efectores de la respuesta inmunitaria del hospedero. Los mecanismos de patogénesis del virus se pueden agrupar en dos áreas principales, daño directo por el virus y daño producido por la respuesta del hospedero. En el primer tipo de daño, participan factores virales y celulares (Zuniga, Torres et al. 2011). En el segundo tipo es clave la regulación o desregulación de la red de citocinas (mensajeros químicos que orquestan la respuesta inmunitaria); no obstante, si su producción es excesiva, pueden ser responsables de la severidad de la infección. Además, el VIA cuenta con diferentes mecanismos para evadir dicha respuesta inmunitaria; entre ellos se encuentra la variación antigénica generada por dos mecanismos principales, la deriva antigénica y la reasociación de segmentos genómicos que pueden provenir de diferentes especies de hospederos. Dichos cambios, principalmente en la HA y la NA, hacen que la inmunidad colectiva estimulada por cepas de brotes anteriores, pierda su efectividad (Taubenberger and Morens 2009, Taubenberger and Kash 2010).

## Respuesta inflamatoria

La duración de la enfermedad es aproximadamente de 6-7 días, la gente con bajos niveles de excreción viral a menudo tienen pocos síntomas o son asintomáticos. El principal daño observable mediante broncoscopia en individuos con la influenza aguda típica y sin complicaciones, es la inflamación. Ésta es difusa y se presenta en la laringe, la tráquea y los bronquios. Además, las biopsias de humanos y ratones infectados con el virus, revelan desde pérdida leve de células hasta descamación extensa, así que el daño producido de manera directa por el virus es considerable; y el daño puede ser causado por lisis de las células, lo mismo que por apoptosis inducida por el virus (Renegar, Small et al. 2004). Observaciones adicionales indican que una buena parte de los síntomas se deben a la respuesta del huésped. La respuesta inflamatoria es en principio un mecanismo de defensa, pero cuando se da de manera intensa, el tejido puede resultar afectado por los productos de la inflamación. En el caso de la infección del ser humano, el daño epitelial va acompañado de un infiltrado celular compuesto principalmente de neutrófilos, linfocitos y macrófagos, y de la producción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas, IL-1 $\beta$  IL-4, IL-6, IL-8, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), interferones (IFN- $\alpha$ , IFN-lambda e IFN- $\gamma$ ). Se ha experimentado la administración de citocinas como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$  y se ha observado que inducen cuadros con malestares sistémicos muy similares a la

influenza (Baumgarth and Kelso 1996, Hayden, Fritz et al. 1998, Welliver, Garofalo et al. 2007).

### **Procesos de coagulación**

Cuando ocurre un daño mecánico o químico en la pared vascular, se involucran una gran cantidad de proteínas del endotelio, una de ellas es el factor tisular (FT) que tiene una ubicación sub-endotelial y cuando es expuesto al flujo sanguíneo y se une a factores del plasma sanguíneo circulantes, como el Factor VII, de esta manera se forma un complejo con proteínas circulantes en sangre (que se encuentran en un estado zimógeno) cuando se forma el complejo FT-Factor VIIa, y da inicio a la cascada de coagulación, y propicia la activación de otros zimógenos, (factor IX, X que pasan a ser factor IXa y Xa). Se propicia la activación de trombina, que es el producto del proceso de coagulación (Butenas 2012). El proceso de coagulación comprende tres fases importantes, 1) Inicial; donde el FT-Factor VII activan al Factor X propiciando la formación de protrombina a trombina. 2) Amplificación; la trombina, junto con el calcio de la sangre y fosfolípidos ácidos retroalimentan a los factores de la coagulación para acelerar la activación plaquetaria. 3) Propagación, donde la trombina, plaquetas y factores de coagulación activan grandes cantidades de factor X llevando a la formación de trombina y fibrina en proporciones mayores (Chu 2011).



## **Endotelio y proteínas involucradas en el sistema hemostático.**

El factor tisular (FT), también es conocido como el factor III, el cual proporciona protección vital a los órganos propensos a daño mecánico; se encuentra ubicado en todas las células que están en contacto con la sangre y es necesario para evitar las hemorragias internas. La expresión del FT se encuentra en células de órganos altamente vascularizados como en el cerebro, la placenta, los pulmones, el corazón, el riñón, el intestino, los testículos y el útero (Osterud and Bjorklid 2006). El FT circulante es derivado de la expresión de las células sanguíneas (ejemplo monocitos, macrófagos, granulocitos y plaquetas), el FT tiene un tamaño de 263 aminoácidos y se clasifica como CD142, con 219 aminoácidos en el extremo *N* terminal, 23 aminoácidos en su dominio transmembranal y 21 aminoácidos en el extremo *C*-terminal. La región extracelular del FT contiene el dominio de unión a FVII/VIIa. Cuando hay ruptura en el endotelio se genera una forma soluble extracelular del FT (FTs), que también puede ser liberada del endotelio en respuesta a citocinas inflamatorias. El dominio citoplasmático del FT puede regular negativamente su expresión por señales intracelulares por ejemplo la supresión de Erk 1/2 (Petersen, Valentin et al. 1995, Chu 2005, Szotowski, Antoniak et al. 2005).

El FT es el iniciador extrínseco en la coagulación y tiene un papel integral en la cascada de la coagulación, en la generación de la trombina. La trombina está estrechamente

relacionada con trombosis y disfunciones cardiovasculares (Chu 2006, Furie and Furie 2008). La actividad del dominio extracelular del FT lleva a la secuencial generación de los mediadores de la coagulación (FVIIa, FIXa, FXa y trombina (FIIa)), y la producción de fibrina que es una molécula pro-inflamatoria (Chu 2005).

En general el incremento en la expresión del FT esta mediado por la activación de señales intracelulares de las cinasas (como PKC, MAPK) y factores de transcripción como AP-1, NF- $\kappa$ B y Erg-1 (Chu 2005). Por el contrario la regulación a la baja del FT se ha reportado que es inducida por inhibidores de reductasa como el HMG-CoA (Steiner, Speidl et al. 2005, Wei, Cui et al. 2007), inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), fármacos como paclitaxel, lisofosfatidilcolina, insulina, nicotinamida, óxido nítrico (ON) o el activador de guanilato ciclasa soluble, hidroxurea, piruvato etílico, dimetil sulfoxido (DMSO), adiponectina, ácido retinoico, o vitamina D3, por mencionar algunos, (Falanga, Marchetti et al. 1996, Saito, Koyama et al. 1996, Gerlach, Keh et al. 1998, Engelmann, Zieseniss et al. 1999, Napoleone, Di Santo et al. 2000, Kunieda, Nakagawa et al. 2003, Ungerstedt, Heimersson et al. 2003, Steffel, Hermann et al. 2005, Camici, Steffel et al. 2006, Maugeri, Giordano et al. 2006, van Zoelen, Bakhtiari et al. 2006, Chung, Koyama et al. 2007, Wang, Yang et al. 2007, Chen, Zhang et al. 2008, Gerrits, Koekman et al. 2009) .

El FT es fácilmente susceptible a una activación proteolítica por la ruptura del enlace peptídico entre Arg 152 e Ilu 153 por las proteasas de serina circulantes en la sangre como FXa, FIXa, FXIIa, FIIa o la plasmina. Generando dos cadenas pequeñas del FVIIa (Butenas, Orfeo et al. 2008).

Con un ambiente inflamatorio presente, la trombina activa plaquetas a través de los receptores activados por proteasas (PAR). PAR-1 es un receptor primario para la trombina por el cual se genera una agregación plaquetaria (Tapparelli, Metternich et al. 1993) . La agregación plaquetaria genera la formación del trombo, cuando esto es retroalimentado positivamente se llega a ocasionar la coagulación intravascular diseminada (CID) (Soslau, Class et al. 2001).

Los receptores activados por proteasas (PAR's) son una familia de receptores de los cuales se conocen PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4. Están acoplados a proteínas G. Los PAR's están extensamente distribuidos en el cuerpo, (Sidhu, French et al. 2014) . PAR es expresado por células como fibroblastos, miocitos, plaquetas, neutrófilos, macrófagos y endotelio (Austin, Covic et al. 2013). Las proteínas PAR se ubican en la membrana plasmática contiene 7 pases transmembranales un dominio amino terminal que abarca un péptido señal de 17 a 26 residuos de aminoácidos y un pro dominio entre 11 y 30 aminoácidos, tres "loops" intracelulares tres "loops" extracelulares y un dominio intracelular *carboxi*-terminal de 13 a 51 residuos de aminoácidos (Hamm 2001). Para facilitar la unión a la trombina y su proteólisis PAR-1 contiene un dominio huridina-like con el amino terminal (Macfarlane, Seatter et al. 2001) y es el sitio de unión primario a la trombina. Cuando se lleva acabo el corte proteolítico en el dominio extracelular se genera una nueva forma de dominio N- terminal que actúa como ligando del segundo un "loop" externo en Glu 260 activando el heterodímero de las proteínas G y disparando una cascada de señalización intracelular (Mackie, Pagel et al. 2002). La activación de PAR-1 dispara la inflamación, su activación lleva a la

producción de interleucinas (IL-6/8 y IL-1 $\beta$ ). La habilidad de PAR para mediar la inflamación va de la mano con la coagulación, se sabe que PAR transmite señales proinflamatorias. La señalización a través de PAR mejora la expresión de IL-6 – IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, ICAM-1, TGF- $\beta$ , VEGF, P-selectina y Erk/ NF- $\kappa$ B/iNOS, también mejora la hidrólisis de PI la expresión de COX-2, y aumenta la el movimiento de Ca<sup>+2</sup>, la agregación plaquetaria y adhesión de macrófagos (Chu 2005, Chu 2011).

## **ANTECEDENTES.**

### **Daño a endotelio por otros virus.**

Los virus hemorrágicos tienen la capacidad de generar desregulaciones vasculares. El daño vascular se manifiesta en etapas tempranas de la enfermedad como hipotensión leve, enrojecimiento de la piel, y vasodilatación conjuntival. Conforme la enfermedad avanza el daño vascular con derramamiento capilar causa edemas y daño en las cavidades corporales. Las hemorragias ocurren cuando el paciente genera trombocitopenia o una severa disfunción plaquetaria, en los casos más severos la desregulación vascular y el daño capilar llevan a un shock, el cual es característico de las fases terminales de los virus hemorrágicos (Paessler and Walker 2013).

Entre los virus hemorrágicos que se conocen se pueden mencionar el virus marburg, el virus del ébola (de la familia de *Filoviridae*), y el virus del dengue (de la familia

*Flavivirus*). Estos virus generan daños patológicos severos, aunque el modo por el cual estos virus provocan patologías varía de unos a otros, siendo cuatro los mecanismos principales. 1) daño vascular por la invasión directa en las células del endotelio por el virus; 2) desregulación de la coagulación con presencia de trombocitopenia, función plaquetaria anormal, desajustes en la producción hepática de factores de coagulación y la presencia de coagulación intravascular diseminada CID, 3) desajuste inmunológico provocando inhibición de la respuesta inflamatoria permitiendo una replicación viral descontrolada; y 4) daño celular directo en determinados órganos debido a la acción del virus o la respuesta inflamatoria del hospedero (Domingo-Carrasco and Gascon-Bustrenga 2005) . El VIA aunque es un virus respiratorio ha presentado reportes en los cuales muestran daños patológicos como los mencionados anteriormente, que son propios de los virus hemorrágicos (Armstrong, Wang et al. 2012).

### **Reportes de problemas trombo vasculares asociados al virus de influenza.**

Las infecciones por VIA que pueden llegar a ser fatales se caracterizan por que generan daño al pulmón, en donde se incrementa la permeabilidad de la microvasculatura generando hipoxia y falla respiratoria (Dominguez-Cherit, Lapinsky et al. 2009). Una vez que se han infectado las células del epitelio por el VIA, se sabe que también pueden infectar a las células del endotelio ya que poseen residuos de AS  $\alpha$ -2,6, la expresión de estos residuos se incrementan cuando las células endoteliales

son estimuladas con citocinas, como ocurre en infecciones graves. Además de que las células del endotelio tienen un papel importante en la regulación de las citocinas después de la infección con el VIA (Hanasaki, Varki et al. 1994). Se tienen reportes de que, tanto *in vivo* como *in vitro*, donde se ha observado que el VIA induce una mayor cantidad de citocinas y quimiocinas en comparación con cepas menos virulentas de influenza (Korteweg and Gu 2008, Hui, Lee et al. 2009). A su vez, los macrófagos, bajo estimulación por el virus, pueden secretar una cantidad adicional de factores solubles, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN-  $\alpha$  y  $\beta$ , proteínas inflamatorias de macrófago (MIP-1a, MIP-1b, y MCP-1), (Cheung, Poon et al. 2002). La capacidad de los macrófagos para producir citocinas se ha relacionado con la severidad de la enfermedad (Cannell, Vieth et al. 2006). En concreto, se ha descrito que el principal efecto de la infección por el VIA es la activación de la inflamación, la cual puede exacerbarse y generar el fenómeno conocido como tormenta de citocinas (cytokine storm) que contribuye a aumentar los índices de morbi-mortalidad en los humanos. La tormenta de citocinas es un fenómeno generado principalmente en el endotelio vascular, el cual experimenta un desequilibrio hemostático y efectos destructivos generando procesos de coagulación, edema vascular, falla multiorgánica y finalmente la muerte (Bautista, Chen et al. 2009). Existen evidencias clínicas en las que se han descrito ampliamente que durante una infección por el VIA en pacientes con algún tipo de compromiso inmunológico se pueden generar procesos inflamatorios exacerbados que pueden modificar la regulación hemostática y generar CID (Dominguez-Cherit, Lapinsky et al. 2009, Bunce, High et al. 2011, Armstrong, Wang et al. 2012)

## **JUSTIFICACIÓN**

La influenza es un problema de salud pública a nivel mundial, producida por un virus altamente contagioso, ya que es recurrente en determinadas épocas del año y genera un alto índice de morbi-mortalidad, por lo que es necesario conocer los mecanismos relacionados con su patogénesis. Recientemente se han generado evidencias en donde los procesos de inflamación y coagulación podrían estar involucrados en la infección por el virus de influenza, los cuales son poco conocidos. Con el presente trabajo se pretende aportar nuevos datos que ayuden a entender estos mecanismos patogénicos.

## **HIPÓTESIS**

La activación del Factor Tisular en el endotelio vascular por efecto de la infección del virus de influenza A activa la cascada de coagulación y genera procesos inflamatorios y donde se involucra la participación de los receptores activados por proteasas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si durante la infección por el virus de influenza A, la sobre expresión del Factor Tisular promueve el proceso inflamatorio y de coagulación en células endoteliales.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar si la infección de células endoteliales por el virus de influenza A (H1N1 2009) aumenta la cantidad del factor tisular.
- Evaluar la participación de PAR 1 durante la activación del proceso inflamatorio en células endoteliales infectadas con virus de influenza A (H1N1 2009).
- Establecer si el virus de influenza A (H1N1 2009) promueve la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B.
- Determinar si la infección de HMEC-1 por el virus de influenza A (H1N1 2009) activa la expresión de quimiocinas inflamatorias como IL-8- IL-6.



## **MÉTODOS**

### **Cultivo celular**

Las células de riñón canino Madin-Darby (células MDCK, ATCC) se cultivaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en medio libre de suero Ultra-MDCK (LONZA). Las células endoteliales de microvasculatura humana (células HMEC-1, ATCC) se cultivaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo MCDB-131 (SIGMA). El medio de cultivo fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (INVITROGEN), 1µg/ml de hidrocortisona (SIGMA), 10ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante (SIGMA) y 10mM de L-glutamina (INVITROGEN).

### **Propagación del virus de influenza A H1N1.**

La línea celular MDCK es altamente permisiva a la infección por el virus de influenza, debido a esta cualidad es posible generar mayor cantidad de partículas virales infectivas. Las células MDCK se crecieron en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y a una confluencia del 80-90% se infectaron. Para ello se lavaron 3 veces con PBS (pH 7.4 por 3 veces) y se añadió medio nuevo más virus de influenza H1N1 (2009) a una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 1.0, y se dejó incubando a 37°C durante 72 horas, una vez finalizado este tiempo, se recolectó el sobrenadante de la caja de cultivo (con partículas virales infectivas), y se centrifugó a 1300xg por 10 minutos para clarificar el

sobrenadante y se realizó el ensayo de hemaglutinación para determinar las unidades hemaglutinantes del virus recolectado. Este proceso se repitió hasta alcanzar el título viral deseado. Finalmente se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Ensayo de Hemaglutinación**

La prueba se realizó en una placa de fondo cónico con 96 pozos (NUNC). Se colocaron 25  $\mu\text{l}$  de PBS en todos los pozos a usar, y en los primeros se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de virus de influenza A H1N1 (2009). Se realizaron diluciones seriadas dejando un control positivo sin dilución del virus. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos preparados al 0.5% a todos los pozos. Se procedió a incubar durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , y seguido a esto se leyeron los títulos de hemaglutinación. La máxima dilución del virus en la cual se observó la aglutinación de los eritrocitos se consideró como una Unidad Hemaglutinante (UHE), que por convención consiste en  $2 \times 10^5$  partículas infectivas. El título viral, se calculó con respecto a esta relación y se consideró para calcular el volumen de infección.

### **Cinéticas de infección.**

Para las cinéticas de infección se emplearon células HMEC-1 del pase 3 a 6. Los tiempos para las cinéticas de infección se establecieron tomando en cuenta dos factores: efectos inmediatos, es decir si queríamos valorar la inactivación, recambio

y/o transducción de señales moleculares se tomaron en cuenta tiempos cortos de 20 y 60 minutos, por otra parte, para valorar efectos tardíos como la síntesis y/o degradación de mRNA, síntesis y/o reparto de proteínas, se optó por hacer cinéticas de 1, 6, y 24 horas. Todas las cinéticas de infección con el virus de influenza A se realizaron a una MOI de 1.0. Los estímulos con TNF- $\alpha$  (SIGMA) usado como control positivo se realizaron a una concentración de 10 $\mu$ g/ml. Para la estimulación con trombina recombinante (SIGMA) se empleó una concentración de 5U/ml.

### **Extracción de ARN**

La extracción de ARN total se realizó el siguiente método: para el Factor Tisular (FT), se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS, posteriormente se les agregó Buffer de lisis RLT; al lisado celular se le agregó un volumen de etanol al 70%, y se adsorbió a una columna (RNeasy Mini spin column). Posteriormente se lavó la columna, y para eliminar el ADN contaminante se usó el kit DNase I amplificación Grade (SIGMA). Una vez terminado el tiempo de digestión se lavó nuevamente la columna, y para eluir el ARN se utilizó agua libre de RNAsas.

## RT-PCR

Para realizar la retrotranscripción del RNA extraído se utilizaron el kit Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (ROCHE) siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con 150 ng de RNA de cada muestra. Brevemente, cada muestra se acopló con solución de hexámeros al azar a 60°C por 10 minutos y se enfriaron rápidamente a 4°C. Posteriormente se añadió inhibidor de RNAsas, di-deoxinucleótidos trifosfatados y transcriptasa reversa. El DNA se sintetizó bajo las siguientes condiciones de reacción: 25°C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos y 85°C por 5. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Gen		Secuencia	Tm
β-actina	Sentido	5'CTGGAACGGTGAAGGTGACA'3	58°C
	Antisentido	5'AAGGGACTTCCTGTAACAATGC A'3	
M1	Sentido	5'AAGACCAATCCTGTACCTCTG A'3	62°C
	Antisentido	5'CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC '3	
Factor Tisular	Sentido	5'TCCCGAACAGTTAACCGGAA'3	60°C
	Antisentido	5'GACCACAAATACCACAGCTCCA' 3	

Oligonucleótidos obtenidos de (Wang, Huang et al. 2008)

## **qPCR**

Las secuencias específicas de  $\beta$ -actina, FT y M1 se encuentran en la Tabla 1. Las PCR en tiempo real se realizaron usando el kit SsoFast Evagreen Súper mix (Bio-Rad) por 35 ciclos. Brevemente, se usaron 2  $\mu$ l del producto de la retrotranscripción para un volumen total de reacción de 20  $\mu$ l. Los pasos de desnaturalización se realizaron a 98°C por 2 min y los pasos de alineamiento duraron 10 segundos a la temperatura estandarizada para cada gen que se muestra en la Tabla 1. Las reacciones se realizaron utilizando el equipo StepOnePlus (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados con el programa StepOneSoftware versión 2.3 (Applied Biosystems) y son presentados como cantidad relativa de mRNA ( $\Delta\Delta$ CT). Se utilizó al gen de la  $\beta$ -actina como control endógeno.

## **Electroforesis.**

Las células HMEC-1 fueron lisadas con buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas. A continuación, se realizó la cuantificación proteica de los extractos mediante la técnica de Bradford. Las muestras fueron desnaturalizadas por calor en baño María a ebullición por 5 minutos; y posteriormente sometidas a una separación electroforética en presencia de SDS, para lo cual se emplearon geles discontinuos de

acrilamida al 12%, en relación 30:0.8 acrilamida:bis-acrilamida, usando una cámara Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) a 100 V hasta que el frente de corrida (visible por la banda azul de bromofenol) entró en el gel separador, después la corriente se bajó a 80 V aproximadamente 2 horas.

### **Inmunoanálisis (“Western blot”).**

Después de la electroforesis, los geles de acrilamida se sometieron a una transferencia vertical húmeda a membranas de PVDF (Bio-Rad) por una hora a 300 mA constantes. Las membranas fueron bloqueadas por una hora, e incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios dirigidos contra I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, Erk2, y FT (Santa Cruz Biotechnology); Actina (Becton, Dickinson and Company); GAPDH (Abcam) y PAR-1 (R&D systems). Para revelar, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano y se revelaron en un equipo ChemiDoc MP System (Bio-Rad) con ayuda de una solución de revelado de Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad). El análisis diferencial de los geles bidimensionales se llevó a cabo con el programa PD-Quest Advanced 8.0.1 (Bio-Rad).

### **Inmucitoquímica (ICQ).**

Las células HMEC-1, se sembraron en laminillas Chambers Slide de 4 pozos (NUNC) hasta tener una confluencia del 60%. Una vez obtenida la confluencia se empezaron los tratamientos con los siguientes estímulos: Sin estímulo; Virus de influenza A H1N1

(2009); TNF- $\alpha$  y Trombina (control positivo). Los tiempos manejados fueron 1, 6 y 24 horas (cada laminilla contenía los estímulos mencionados). Finalizando cada tiempo, se fijaron con PFA al 4% y acetona fría. El revelado de las ICQ se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC Kit (Abcam), que en breve consistió en bloqueo de epítomos inespecíficos por 10 min, incubación con anticuerpos primarios y detección con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa mediante polímeros. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: PAR-1 (R&D systems), NF- $\kappa$ B, FT y TM (Santa Cruz Biotechnology). Para la detección, los anticuerpos se diluyeron en “solución de dilución universal” (Abcam) en proporción 1:50 y se dejaron incubando toda la noche a 4°C, como control negativo se usó una laminilla con el mismo tratamiento, pero sin agregar anticuerpo primario. Se realizó una contratinción con hematoxilina para contrastar los núcleos del citoplasma.

### **Detección de concentraciones de citocinas.**

Para determinar la concentración de citocinas se usó la técnica de ELISA con el kit específico para IL-6 e IL-8 (BioLegen ELISA MAX Deluxe Sets Pacific Heights Blvd, San Diego, CA). Se basa en un inmunoensayo tipo sandwich con anticuerpos monoclonales específicos para las citocinas (IL-6, IL-8), inmovilizados en una microplaca de 96 pozos en una fase sólida que contiene controles estándares. Donde se colectó los sobrenadantes de las células HMEC-1 con la infección de IVA 1, 6 y 24 horas p.i y con la estimulación con trombina a 1, 6 y 24 horas. Los sobrenadantes se colocaron en los pozos apropiados con una enzima peroxidasa de rábano y un

anticuerpo monoclonal marcado (conjugado). La molécula de la citocina se quedó intercalada entre la fase sólida y el conjugado. Después se incubaron por 2 h en un agitador mecánico a temperatura ambiente, los pozos de la microplaca se lavaron con buffer de lavado para eliminar el conjugado no unido. Posteriormente se adicionó a cada pozo el sustrato proporcionado por el proveedor, incubando nuevamente la microplaca en un agitador mecánico a temperatura ambiente por 15 min. Durante este tiempo el sustrato reacciona con el conjugado unido en los pozos. Después del tiempo de incubación se detuvo la reacción, añadiendo una solución de paro, cambiando el color de azul a amarillo. Finalmente se midió la densidad óptica por lector de microplacas a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Esto se hizo para cuantificar cada una de las diferentes citocinas.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.). Se utilizó distribución de *t* de *student* para determinar diferencias significativas entre los grupos con respecto del control con una  $p \leq 0.05$



## **RESULTADOS:**

### **El virus de influenza A sí infecta a las células endoteliales HMEC-1.**

Existe evidencia de que el VIA puede infectar células endoteliales en otros modelos, (Armstrong, Wang et al. 2012) pero no se ha descrito con precisión si en el modelo de microvasculatura empleado en éste trabajo, ocurre una infección productiva. Para determinar esto, las células endoteliales HMEC-1 se infectaron con el VIA durante 1h, 6h, 24h, a una M.O.I. =1 para evaluar si presentaban efecto citopático y como control de seguimiento se infectaron en paralelo células MDCK, las cuales son altamente permisivas a la infección por el VIA H1N1. Las células MDCK presentaron efecto citopático a partir de las 24 horas post infección (Figura 5), y este efecto va en aumento ocasionando un desprendimiento de la monocapa con mayor cantidad de células refringentes (figura 5 D).

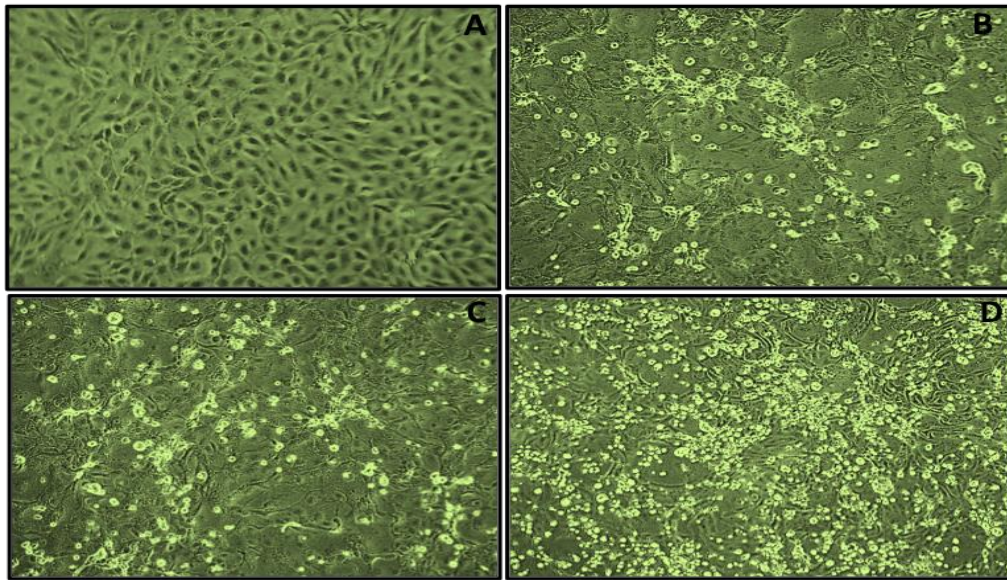


Figura 5) Cultivo de células MDCK vistas al microscopio óptico con un aumento 10X. A) monocapa de células sin infección. B) Células MDCK 24 horas post-infección. C) Células MDCK 48 horas post-infección. D) Células MDCK 72 horas post-infección. Se observa un aumento respecto al tiempo en la cantidad de células refringentes, generando un deterioro de la monocapa, mayoritariamente presente a las 72 horas post-infección.

Debido a que en las células HMEC-1 no se observó un efecto citopático temprano como en las células MDCK, se procedió a detectar la expresión del gen M1 viral por PCR en tiempo real (qPCR); para ello se extrajo RNA total de las células HMEC-1 infectadas por 1h y 6h y a partir de concentraciones equivalentes de RNA (150ng) se sintetizó DNA complementario que se usó como molde en las reacciones de qPCR (Figura 6). El razonamiento detrás de ésta aproximación experimental es que sólo si la infección viral es productiva, se detectarán los mensajeros correspondientes a la proteína viral M1.

En la figura 6 B se observa que a 1h post infección se detecta ya el RNA mensajero de M1, y sus niveles se ven incrementados a las 6 horas post infección, donde el aumento fue de 5 veces con respecto a la infección de 1h. Lo anterior indica que el VIA H1N1 pudo ingresar a las células y que se producen las proteínas virales estructurales necesarias para la formación de la cápside.

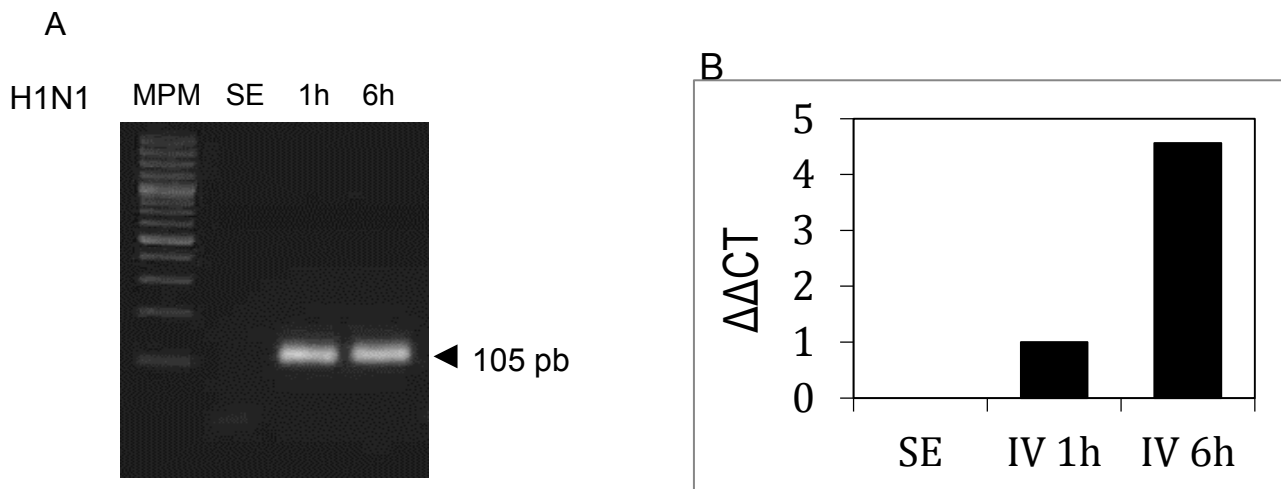


Figura 6) Infección del virus de influenza A en células HMEC-1 con una M.O.I de 1. A) Detección del mRNA de proteína M1 viral por PCR punto final, sin estímulo (SE), a una hora (1h) y a 6 horas (6h) posterior a la infección (p.i.). B) Cuantificación del mRNA de M1 por qPCR sin estímulo, una hora y 6 horas p.i. Se observó un aumento en la síntesis de M1 viral en las células HMEC-1 desde 1 hora y con un incremento 5 veces mayor a las 6 horas p.i.

## **El Factor Tisular no presenta cambios en presencia de influenza.**

Para determinar si el FT se incrementa durante la infección con H1N1 en el endotelio vascular, como sucede en otros modelos de infección (Huerta-Zepeda, Cabello-Gutiérrez et al. 2008), se evaluó por “western blot” la cantidad de FT presente en extractos totales de células HMEC-1. Las células HMEC-1, fueron infectadas por 1, 6 y 24 horas con el VIA H1N1. En la figura 7 A se observa, de izquierda a derecha, que el factor tisular no aumenta con respecto a la banda que corresponde al control de carga (GADPH). La aparente disminución observada a las 24 horas post infección, coincide con la disminución en la intensidad de nuestro control de carga (GADPH) que en este punto también muestra una decremento. Al evaluar la relación entre el FT y GAPDH, usando los valores obtenidos del análisis densitométrico, se observa que a 1h post-infección ocurre un moderado decremento (aproximadamente 5%) en la cantidad del FT, el cual se mantiene hasta las 6 horas post infección y a las 24 horas después se presenta un decremento moderado (cercano al 20%) respecto a su cantidad basal. Lo anterior sugiere que el VIA H1N1 no regula ni positivamente ni negativamente el comportamiento del factor tisular.

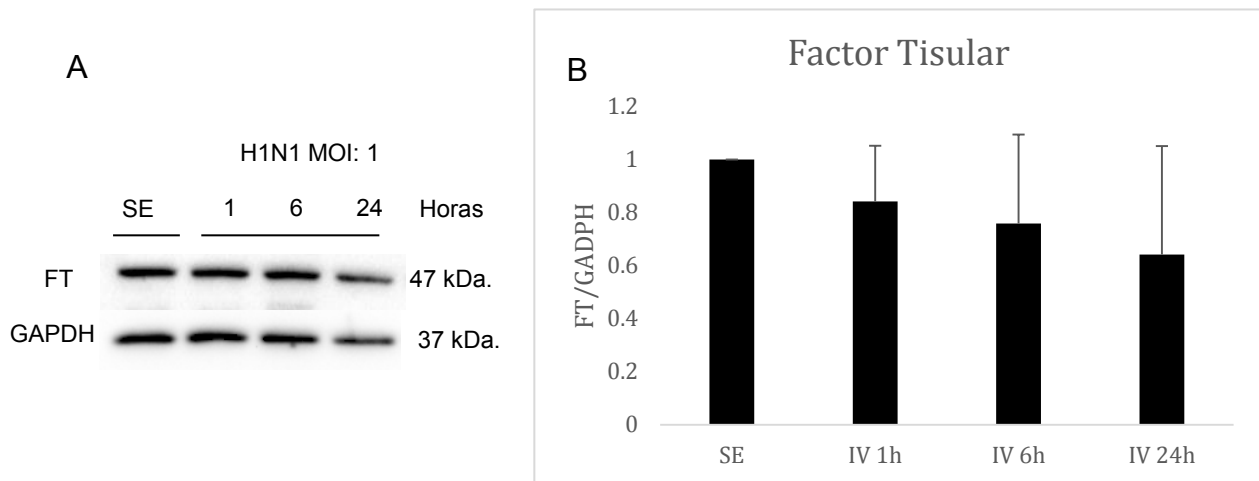


Figura 7) Infección de células HMEC-1 y detección del FT. A) Las células HMEC-1 se les agregó el virus de influenza H1N1 (2009). M.O.I.=1 durante 1, 6 y 24 horas y se realizó western blot. B) Análisis densitométrico del FT, en el cual no se observa una alteración en los tiempos de infección establecidos (n=4).

Para confirmar el efecto del VIA H1N1 sobre los niveles de FT se infectaron las células a una M.O.I. de 10, ya que esto asegura que una mayor cantidad de partículas virales infectivas llegan a estar en contacto con las células, y se probó una cinética de infección idéntica a la ya mencionada. Se observa que a 1h y 6h post infección, la cantidad de FT presenta un incremento entre el 20 y el 40%, mientras que a las 24h el aumento fue de aproximadamente un 50%. Con este aumento de la M.O.I. el incremento en el FT con respecto al M.O.I. de 1 fue moderado. Lo que indica que un incremento en la presencia de partículas virales no aumenta sustancialmente los niveles de FT (Figura 8). Para evaluar si lo obtenido por el análisis de “western blot” a nivel de proteína, tiene paralelo a nivel de mensajero, se realizó un ensayo de PCR

punto final para factor tisular, a partir de extractos de RNA de células HMEC-1 infectadas con M.O.I. de 1.

En la figura 9 se muestra el gel de agarosa con la amplificación del fragmento de factor tisular (9 A) y el análisis densitométrico de la concentración relativa de cada banda (9 B) normalizando contra la cantidad basal de FT en células HMEC-1. Se observa que la expresión del FT reduce su cantidad en un 60% a 1 hora post infección con respecto al basal, sin embargo se recupera a las 6 y 24 horas post infección pero sin superar los niveles basales, indica que efectivamente el VIA H1N1 no genera un efecto de aumento en la cantidad de síntesis de ARNm para FT.

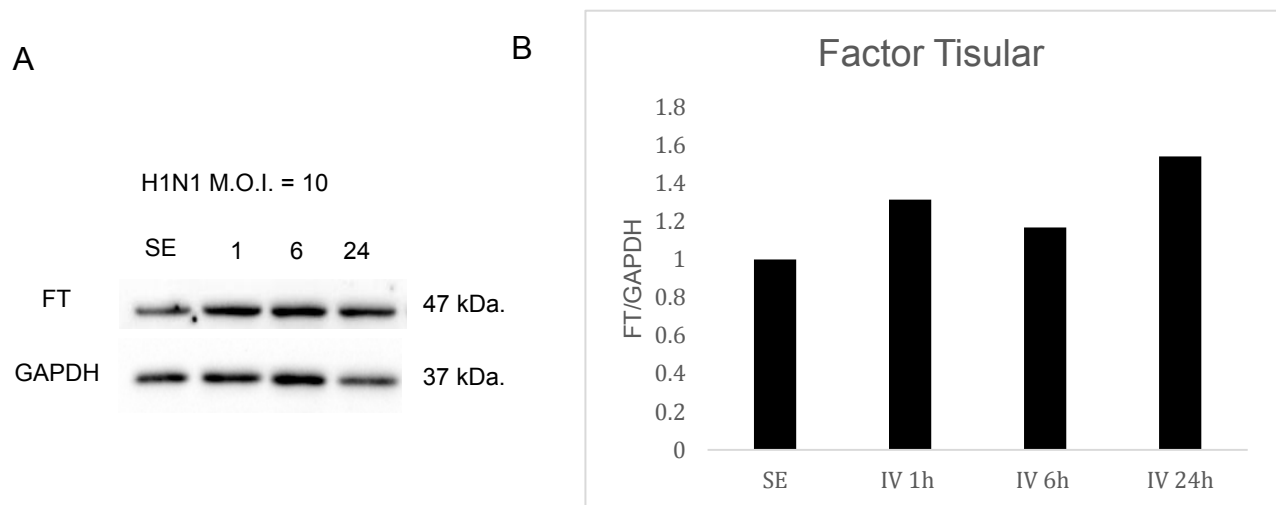
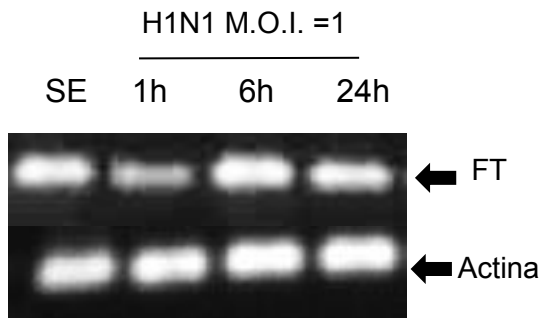


Figura 8) Infección de células HMEC-1 con un M.O.I. =10 y detección de Factor Tisular A) Las células HMEC-1 se les agregó el virus de influenza H1N1 (2009), durante 1, 6 y 24 horas y se realizó “western blot”. B) Análisis densitométrico de factor tisular. Se observa un aumento mínimo a las 24 horas post infección respecto al sin virus H1N1 (SE).

A



B

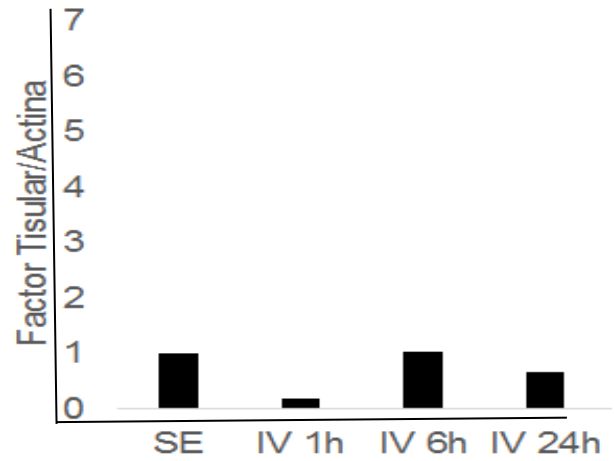


Figura 9) PCR punto final de factor tisular. A) Gel de agarosa en donde se detecta los oligos amplificados para factor tisular. B) análisis densitométrico de los resultados del PCR punto final.

## **Influenza virus A H1N1 no induce la translocación de NF- $\kappa$ B pero encienden una vía de MAPK cinasas**

La infección por IVA H1N1 cursa frecuentemente con un incremento sistémico de los niveles de citocinas pro-inflamatorias que puede desembocar en tormenta de citocinas y se ha sugerido que puede exacerbarse por la participación del endotelio (Szotowski, Antoniak et al. 2005). El endotelio es el principal orquestador de la tormenta de citocinas y su activación por moléculas como el TNF- $\alpha$  promueve un fenómeno de amplificación de la respuesta a través de la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (Teijaro, Walsh et al. 2011). Para evaluar si la infección por H1N1 activa las respuestas mediadas por NF- $\kappa$ B en el endotelio de la microvasculatura, se analizó el efecto de la infección sobre la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , que es el inhibidor citoplasmático del complejo p65-p50 (NF- $\kappa$ B). En la figura 10 B se muestra que I $\kappa$ B $\alpha$  no sufre alteración alguna por la infección con el virus de IVA H1N1 ya que a 1 y 6 horas posterior a la infección aumenta un 20% respectivamente su cantidad respecto a la condición basal sin IVA H1N1 y a las 24 horas post infección I $\kappa$ B $\alpha$  se incrementa a su condición inicial lo cual implica que p65-p50 permanece en el compartimento citoplasmático. En la figura 10 C se corrobora la detección por ICQ la cual confirmó, que 24 horas post-infección p65 se mantiene en el citoplasma en cantidades comparables con la condición sin infección.



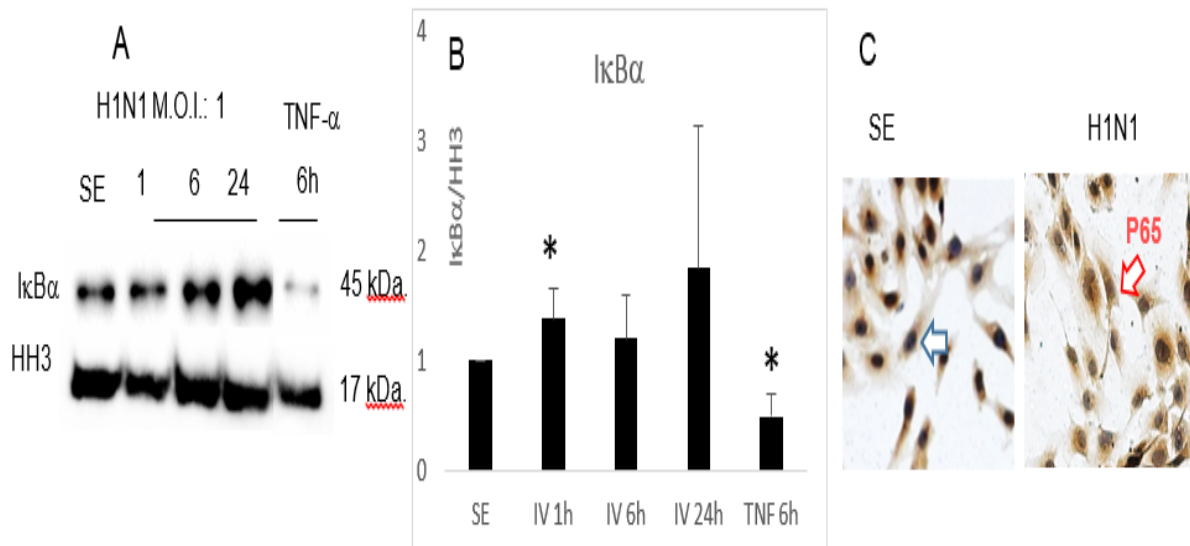


Figura 10) Efecto del virus de influenza H1N1 (2009) sobre la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación de NF- $\kappa$ B (p-65) al núcleo, en células HMEC-1. A) Detección de I $\kappa$ B $\alpha$  por “western blot” en condiciones de 1, 6 y 24 horas posterior a la infección, comparado respecto al sin estímulo (SE) o con H1N1 (IV). B) Análisis densitométrico no se observa disminución de I $\kappa$ B $\alpha$ , por el contrario, a las 24 horas post infección incrementa al doble de su cantidad basal. C) detección por inmunocitoquímica de NF- $\kappa$ B (p-65) en HMEC-1 sin estímulo y una hora posterior a la infección. La flecha en (SE) azul señala que la proteína se encuentra en el citoplasma, en la imagen de la derecha (H1N1) roja señala el núcleo de la célula donde se ve la translocación de p-65. n=3 (p< .05)

Aunque no se observara una alteración en la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , se ha reportado que la infección por el IVA H1N1 puede activar a diferentes miembros de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y estas a su vez promover la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (Kumar, Xin et al. 2008). En nuestros experimentos de “western blot” observamos un incremento en la fosforilación de ERK después de la

infección con H1N1, sin embargo; no se induce la degradación de  $I\kappa B\alpha$ . En la figura 11 A se muestra la imagen de “western blot” donde se analiza la abundancia de ERK fosforilado (p-ERK) utilizando extractos proteicos totales de células infectadas por 1h, 6h y 24h. ERK2 al ser una proteína constitutiva se utilizó como control de carga, y al comparar los niveles de p-ERK contra ERK2 se observa que con IVA H1N1 se incrementa la intensidad de las bandas de p-ERK. El análisis de la densitometría nos muestra que a una 1 hora post infección se ve un leve incremento de un 25% en la proteína, a las 6 horas se empareja a la condición basal sin IVA H1N1, y 24 horas post infección aumenta el doble en su cantidad respecto a la condición basal, indicando que la vía de las MAPK cinasas está encendida.

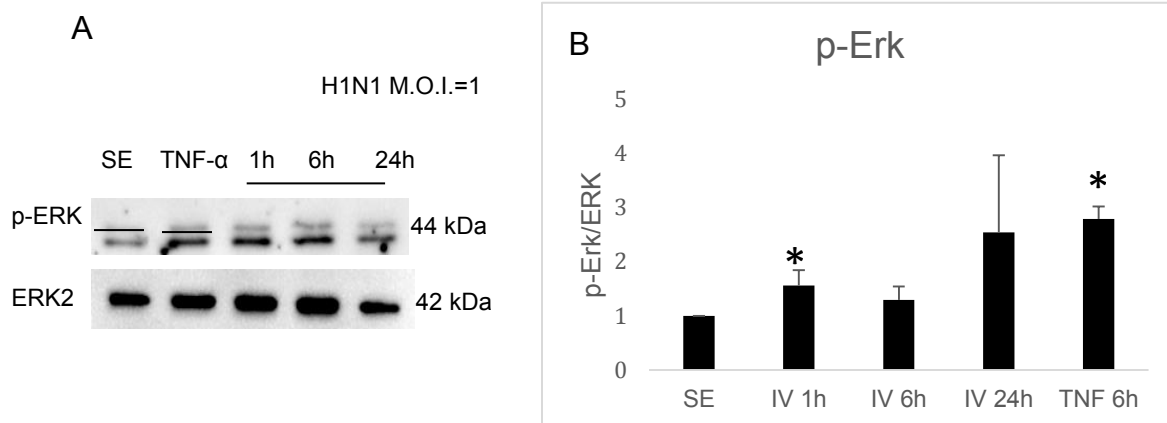


Figura 11) Efecto del virus de influenza H1N1, sobre p-ERK. A) células HMEC-1 infectadas a distintos tiempos, 1, 6 y 24 horas, además como control positivo se utilizó TNF- $\alpha$ . B) Análisis densitométrico del “western blot”. Se muestra p-ERK en su estado basal (SE), con el control de TNF- $\alpha$  se ve incrementada la fosforilación de ERK así como cuando están con el virus de influenza durante 24 horas. n=3 (p<0.05)

### **Influenza virus A H1N1 promueve el aumento de PAR-1 en células HMEC-1.**

La producción de citocinas proinflamatorias se asocia con la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y para explicar el fenotipo pro-inflamatorio y pro-coagulante inducido por H1N1, se descarta que el IVA H1N1 ejerza un efecto directo sobre la activación de NF- $\kappa$ B en el endotelio, como ya se demostró anteriormente (Figura 10). En consecuencia se esperaría encontrar una vía capaz de inducir la activación de NF- $\kappa$ B de forma indirecta tras la infección por H1N1. En la hipótesis original de este trabajo se esperaba que, a semejanza con lo que ocurre en otras infecciones virales, el FT incrementara sus niveles y favoreciera la generación de trombina activa, que a su vez promueve la producción de citocinas. Sin embargo el FT por efecto del H1N1 no incrementa, lo que hizo necesario ir en busca de una molécula alternativa cuya actividad permitiera explicar la relación influenza-inflamación a sabiendas de que las células HMEC-1 expresan al Receptor Activado por Proteasas tipo 1 (PAR-1), también conocido como receptor de trombina, y que éste al activarse promueve la activación de NF- $\kappa$ B, se procedió a analizar el efecto de IVA H1N1 sobre la expresión de PAR-1 en células HMEC-1.

Las células HMEC-1 fueron infectadas con el IVA H1N1 durante 1h, 6h y 24h y se realizaron ensayos “western blot” para medir el efecto del virus sobre PAR-1, en la figura 12 panel A, se muestra el “western blot” de PAR-1 y el control de carga usado

fue actina, las bandas de PAR-1 aumentan de intensidad a 6 horas posterior a la infección, sin embargo a las 24 horas se ve disminuida esta intensidad. El análisis densitométrico correspondiente al “western blot” de PAR-1 (figura 12 B) muestra que PAR-1 a 6 horas post infección aumenta casi al doble (80%) su cantidad respecto a las células sin estímulo, en cambio cuando han transcurrido 24 horas, los niveles de PAR-1 aún mantienen un incremento el cual es menor (alrededor de un 20%) comparado con las células sin estímulo. Para corroborar estos datos obtenidos se realizó un ensayo de inmunocitoquímica con las células HMEC-1 en el cual se experimentaron dos condiciones, 1) Células sin estímulo (SE) y 2) Células con H1N1 durante 6 horas de infección con un anticuerpo dirigido contra PAR-1, lo que se puede observar en la figura 12 C es que efectivamente la cantidad de PAR-1 aumentó en las células con la exposición al IVA H1N1.

El hallazgo de que el IVA H1N1 puede ser capaz de aumentar las cantidades de PAR-1 en las células, sugiere que como efecto de la infección hay más moléculas de PAR-1 susceptibles de ser activadas por la Trombina. De ser así, cabría esperar un que en condiciones pro-coagulantes ocurra un incremento en la degradación de  $I\kappa B\alpha$  y en consecuencia una mayor translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y un incremento en la síntesis de citocinas inflamatorias.

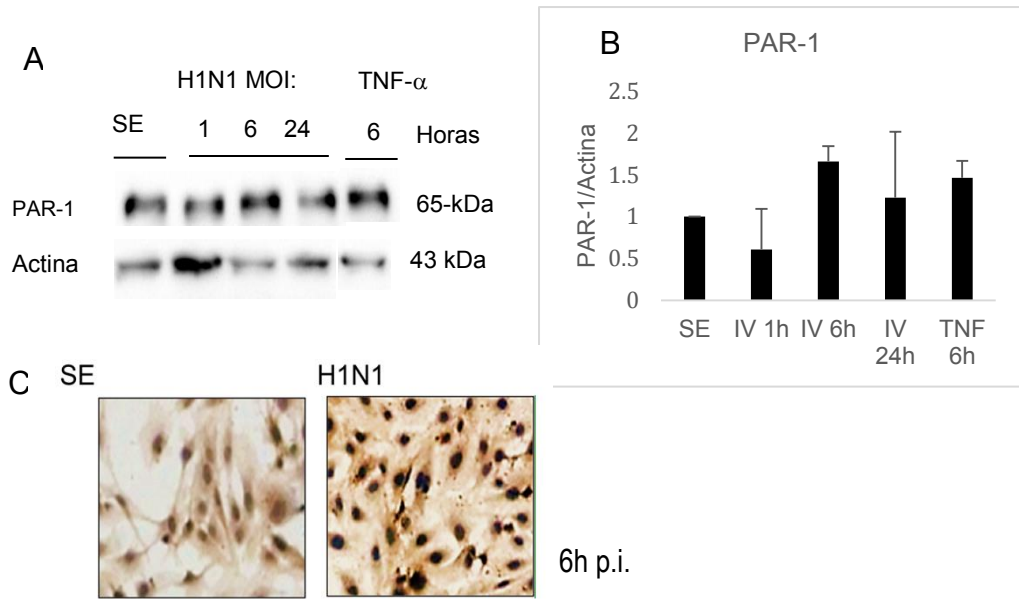


Figura 12) Efecto de la infección por el virus de influenza H1N1 (2009) en la expresión de PAR-1 en células HMEC-1. A) Detección de PAR-1 mediante el “western blot” en células sin estímulo (SE) e infectadas durante 1, 6 y 24. B) análisis densitométrico de PAR-1 contra actina. C) Inmunocitoquímica para la detección de PAR-1 en células SE y células infectadas con H1N1 durante 6 horas. En ambos experimentos se observa un aumento en la cantidad de PAR-1 por efecto de la infección.

## **Translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo por TNF- $\alpha$ y trombina. La trombina, genera la degradación de PAR- 1.**

Para poner a prueba la capacidad de las HMEC-1 para activar a NF- $\kappa$ B tras la inducción por TNF- $\alpha$  que es un estímulo positivo bien documentado (Kumar, Xin et al. 2008, Gerondakis, Fulford et al. 2014), que induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en pocos minutos, se estimularon cultivos de HMEC-1 con 10ng/ml de TNF- $\alpha$  recombinante durante 20 o 60 minutos y se analizó la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en extractos proteicos totales. La Figura 13A muestra que el TNF- $\alpha$  sí promueve la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$ . En la figura 13C se observa que, en comparación con las células sin estimular, el tratamiento con TNF- $\alpha$  sí induce la translocación de p65 al núcleo. Para confirmar lo anterior se obtuvieron extractos nucleares de las células estimuladas con TNF- $\alpha$  y se determinó la presencia de p65 mediante “western blot”, observándose un incremento en los niveles de p65 en las células tratadas (Figura 13B). Así mismo el análisis de retardo en la movilidad electroforética mostró que en los extractos nucleares obtenidos de las células estimuladas con TNF- $\alpha$  sí se observa un complejo de retardo usando oligonucleótido específico para p65 desde los 20 minutos (Figura 13D). Es de resaltar que la infección por H1N1 no genera este complejo en ningún tiempo.

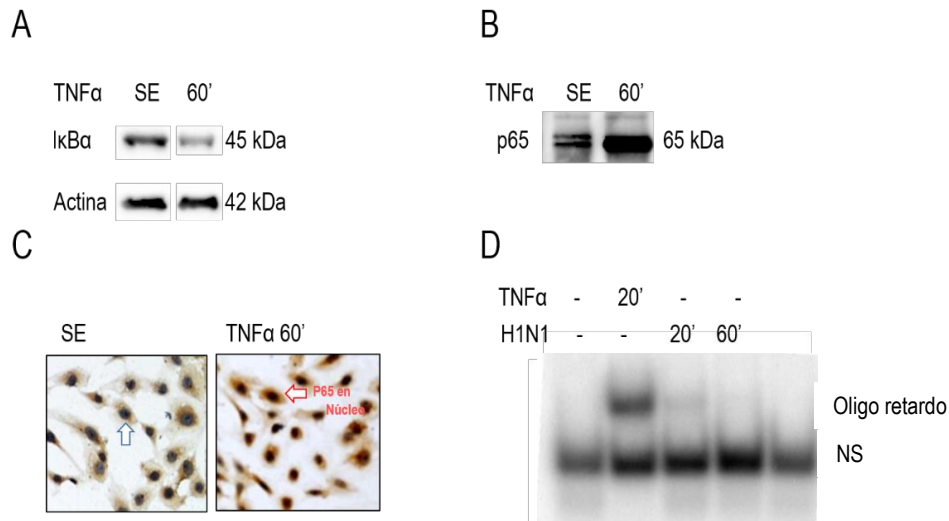


Figura 13) Efecto de TNF- $\alpha$  sobre la translocación de NF- $\kappa$ B (p-65) al núcleo en células HMEC-1. A) detección de I $\kappa$ B $\alpha$  por “western blot” en células sin estímulo (SE) y posterior al estímulo con TNF- $\alpha$  (60 minutos). B) Evaluación de la presencia de NF- $\kappa$ B (p-65) mediante “western blot” en extractos nucleares. C) Inmunocitoquímica para NF- $\kappa$ B (p-65) en células SE y con TNF- $\alpha$  (60 minutos). Ensayo de retardo en la movilidad electroforética con extractos nucleares de células HMEC-1 estimuladas con TNF- $\alpha$  (20 minutos) y H1N1 (20 y 60 minutos) se usaron oligonucleótidos consenso para sitios  $\kappa$ B. Se puede observar una efectiva translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo con el estímulo de TNF- $\alpha$ . Por el contrario no se observó un efecto con el virus H1N1 en el ensayo de retardo.

Ya que observamos que FT no es el enlace sino PAR-1 entre la infección y la inflamación, habría sido necesario reconstituir *in vitro* al sistema completo para averiguar si después de la infección, la pro-trombina es procesada, el PAR-1 es activado y la producción de citocinas inflamatorias es exacerbada. Al no contar con el conjunto total de elementos para dicho ensamble experimental, se avanzó en poner a prueba a los elementos mínimos esenciales del funcionamiento de la vía. Para

determinar si la trombina activa induce la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B a través de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , se realizaron ensayos de “western blot” e inmunocitoquímica. Los tiempos empleados para estos ensayos entre la trombina y las células fueron de 1, 6 y 24 horas. En la figura 14 A, se observa a 1 hora post infección que la cantidad de proteína de I $\kappa$ B $\alpha$  disminuye, y en 6 horas post infección casi no se logra ver la presencia de la proteína, por otra parte I $\kappa$ B $\alpha$  muestra recuperación a las 24 horas post infección. El análisis densitométrico (figura 10B) confirma que la cantidad de I $\kappa$ B $\alpha$  después de 1h post infección disminuye un 20% respecto al estado sin estímulo. Sin embargo; después de 6 h de interacción con trombina, se genera un cambio drástico en la cantidad de I $\kappa$ B $\alpha$  y se observa una disminución del 60% aproximadamente, con respecto al basal de células no estimuladas con trombina, por consiguiente es posible que NF- $\kappa$ B fue liberado y se translocó al núcleo. Transcurridas 24 horas después de la adición de trombina, los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  se recuperan indicando que la trombina activa había dejado de tener efecto en las células HMEC-1. Para poder observar la presencia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en núcleo con la adición de trombina, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica (figura 14 C) con un marcaje de anticuerpo dirigido a la sub-unidad de p-65 de NF- $\kappa$ B a tiempos de 20 minutos. Se pudo observar en el núcleo la precipitación de la diaminobencidina (generada por la actividad de la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario), indicando la presencia la sub unidad p-65 en los núcleos a los 20 minutos de estimulación.



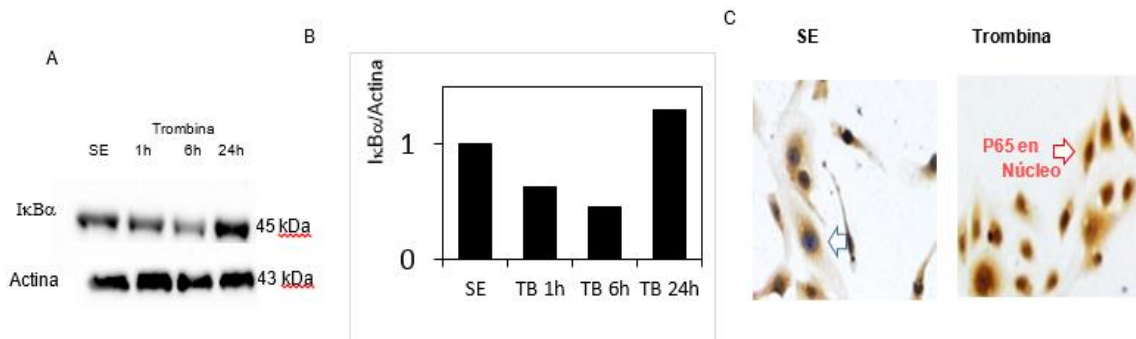


Figura 14) Participación de la trombina en la degradación de IκBα y translocación de NF-κB (p-65) al núcleo. A) Detección de IκBα mediante “western blot” a 1, 6 y 24 horas posterior al estímulo (trombina) B) Análisis densitométrico de IκBα respecto a su control de carga actina . C) Inmunocitoquímica para la detección de NF-κB (p-65) en células sin estímulo y con 20 minutos de trombina.

La trombina, además del efecto observado sobre IκBα, pudimos corroborar que efectivamente es capaz de activar a PAR-1 el cual una vez ocurrido esto es procesado y posteriormente degradado (Coughlin 2000). En la figura 15 A se muestran los resultados de “western blot” de las células HMEC-1 sin estímulo (SE) y estimuladas con trombina a tiempos de 1, 6 y 24 horas, en donde se detectó a PAR-1 y se utilizó actina como control de carga. Se puede observar claramente que a las 6 horas posteriores al estímulo con trombina, disminuye la intensidad de la banda de PAR-1. En el análisis densitométrico se corrobora este resultado (figura 15 B), a una hora después de agregar la trombina, PAR-1 disminuye un 20% respecto al SE y a las 6 horas baja un 90 % respecto al PAR-1 basal, sin embargo a las 24 horas posterior a la incubación con trombina PAR-1 recupera su estado inicial. Para observar la cantidad de PAR-1 en las células HMEC-1 se elaboró una inmunocitoquímica contra PAR-1 sin estímulo y con trombina por 24h (figura 15C) esto concuerda con el “western blot”

antes mencionado (figura 15 A). Reafirmando que si hay una translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo por efecto de la trombina, se realizó inmunocitoquímica en células HMEC-1, sin estímulo y expuestas con trombina 20 minutos, además de una condición de VIA H1N1 por 6h y 20 minutos antes de concluir este tiempo se agregó trombina (figura 15 D) y de esta manera la trombina cortarí a la proteína PAR-1 el cual según nuestros resultados anteriores se incrementó por efecto del IVA H1N1, en este experimento se utilizó un anticuerpo contra NF- $\kappa$ B (p-65) y se observa en la figura 15 D, que efectivamente hay una translocación de este factor de transcripción al núcleo, después de 20 minutos con trombina y se incrementa la translocación de NF- $\kappa$ B cuando las células con infectadas con el virus de IVA H1N1 durante 6 horas.

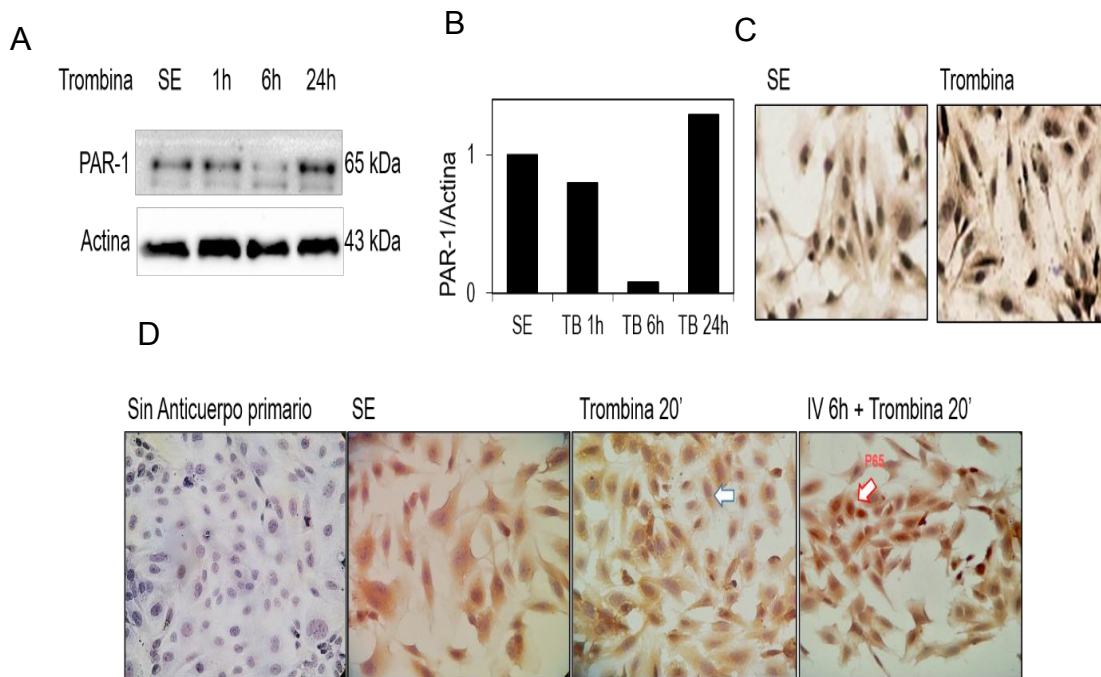


Figura 15) Efecto de H1N1 sobre la actividad de la trombina en células HMEC-1. A) detección de PAR-1 mediante “western blot” en células sin estímulo (SE) y en células con trombina a 1, 6 y 24 horas. B) Análisis densitométrico de PAR-1. C) inmunocitoquímica para observar la presencia de PAR-1 en células SE y células estimuladas con trombina durante 24 horas. D) Inmunocitoquímica para detección de NF-κB (p-65). La trombina disminuye la cantidad de PAR-1 a las 6 horas y se recupera posteriormente a las 24 horas. Se promueve la translocación de NF-κB desde los 20 minutos. La pre-incubación con H1N1 (2009) aumenta PAR-1 e incrementa la cantidad de NF-κB en el núcleo.

### Producción de citocinas inflamatorias.

Para conocer el efecto del IVA en células HMEC-1 y corroborar el de la trombina en la producción de citocinas inflamatorias, los sobrenadantes de las células HMEC-1 infectadas con IVA y estimuladas con trombina se recolectaron para detectar IL-6 e IL-8, ambas citocinas inflamatorias involucradas en la patogénesis de IVA (Hanasaki, Varki et al. 1994, Anrather, Millan et al. 1997), figura 16, el IVA produce IL-6 e IL-8 a partir de 6 horas de infección, y esta cantidad de IL's se incrementan a las 24 horas p.i.(figura 16 A y B), lo mismo ocurre en la estimulación con trombina, pero el efecto de incremento está mayoritariamente presente para IL-8 (figura D).

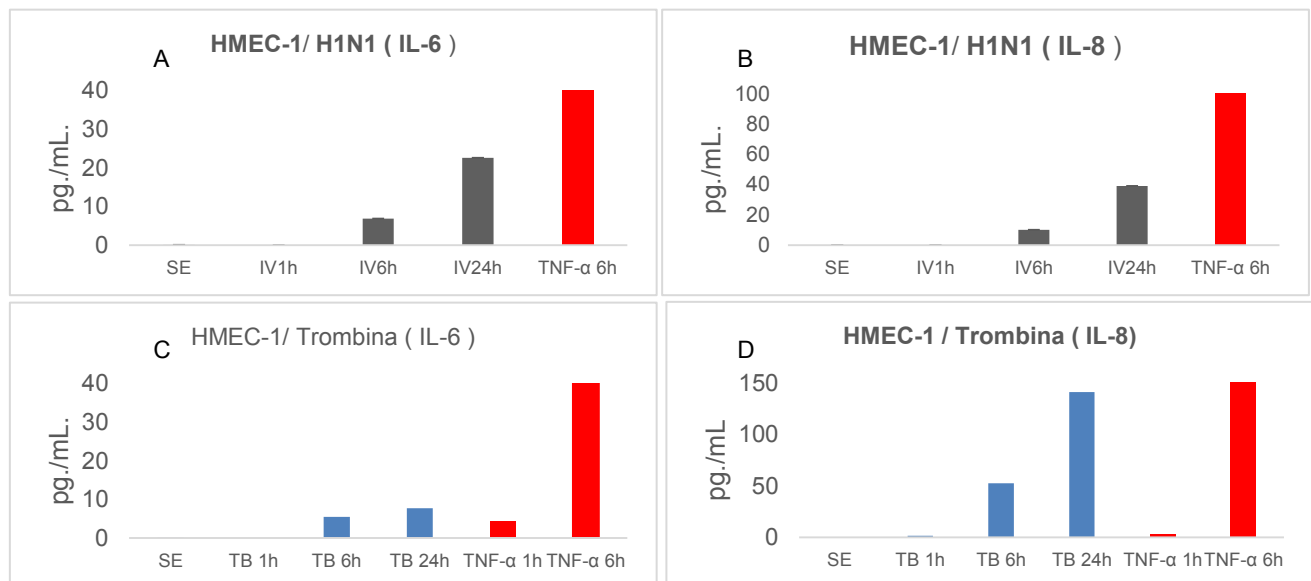


Figura 16) Detección de citocinas inflamatorias de los sobrenadantes de las cinéticas de infección y estimuladas con trombina. A y B) IL-6 y 8, de sobrenadantes de células HMEC-1 con IVA a 1, 6 y 24 horas. C y D) IL-6 y 8, de sobrenadantes de células HMEC-1 con trombina a 1, 6 y 24 horas. n=3 p<.05 (de las infecciones con IVA).

## Discusión

La participación del Factor tisular, en nuestro modelo de estudio (HMEC-1), mostró que el IVA H1N1, no causa un efecto de disminución o incremento sobre esta proteína, ya que a los tiempos en que se realizó la cinética no se reportaron cambios relevantes como ocurre con otros virus (Huerta-Zepeda, Cabello-Gutiérrez et al. 2008) . De hecho la infección con el IVA H1N1 a MOI de 1 y de 10 (figura 7 y 8 B) carecen de efecto sobre el factor tisular. Cabe resaltar que el IVA H1N1 no está considerado como un virus hemorrágico por lo que la falta de FT en el endotelio infectado podría considerarse “normal”. Sin embargo la presencia de FT circulante puede ser producto de múltiples factores ya que en el torrente sanguíneo existen una gran variedad de células que presentan esta proteína (monocitos, macrófagos, granulocitos y plaquetas)(Osterud and Bjorklid 2006, Butenas, Orfeo et al. 2008), por lo tanto el estímulo que haría aumentar la cantidad de FT ocasionado por un virus no hemorrágico y que por lo tanto ayudaría a desencadenar la activación de los factores de la coagulación en las células podría depender de su acción sobre otras células como las ya mencionadas, llegando así, por otras vías a desencadenar el acomplejamiento de las proteínas de la coagulación con el factor tisular, como en los reportes de personas infectadas con IVA H1N1 que generan problemas trombovasculares (Bunce, High et al. 2011, Liutov, Rudakov lu et al. 2013).

Se sabe que la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$  genera un aumento del FT (Nawroth and Stern 1986), esto nos indica que la síntesis del FT podría estar relacionada con la

secreción y acción de citocinas inflamatorias, que como se ha descrito, son activadoras del endotelio vascular y promueven que la cascada de coagulación se active a través del Receptor Activado por Proteasas (PAR-1). Este receptor es una proteína que participa activamente en la activación de la inflamación y de la coagulación. Por lo que es posible que el detonador de la síntesis de dichas citocinas sea el PAR-1. En otros modelos experimentales, se ha descrito que la infección por IV genera un aumento en la expresión de PAR-1 en el epitelio respiratorio de ratones y a su vez un aumento en la generación de citocinas inflamatorias (Khoufache, Berri et al. 2013), por lo que cabe suponer que el PAR-1, en nuestro modelo celular, puede estar desempeñando las mismas funciones que en el epitelio respiratorio, como lo demostramos en los experimentos de “western blot”, en los que se observó que PAR-1 aumenta. PAR-1 es una molécula acoplada a proteínas G y puede señalizar hacia un fenotipo celular inflamatorio o citoprotectivo, dependiendo del sitio de activación que se genere en su región amino terminal. Es de suponer que PAR-1, al estar involucrado en la activación de citocinas inflamatorias, posiblemente la activación de NF- $\kappa$ B sea un evento necesario para que los genes de las citocinas inflamatorias se activen, sin embargo; en nuestro modelo experimental, el IVA H1N1 al parecer no activa la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, como lo demostramos en los ensayos de “western blot”, en los cuales determinamos que la infección por el IVA pdm. (2009), no modifica la presencia de I $\kappa$ B $\alpha$  en los extractos de proteínas citoplasmáticas de células HMEC-1 infectadas, no así cuando las células fueron estimuladas con TNF- $\alpha$ , que como se ha descrito, esta citocina activa la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y como consecuencia de esto, la translocación

al núcleo de NF- $\kappa$ B (Gerondakis, Fulford et al. 2014). Esta vía de señalización es compartida por la activación y expresión del gen del FT, como lo reportado en la literatura (Nawroth and Stern 1986). El aumento PAR-1 como resultado de la infección por el IVA pdm (2009), es un evento nuevo, no descrito para este modelo celular que aunado al hecho de que el IVA H1N1 no induce un aumento en la presencia de FT, nos hace pensar que estamos frente a una nueva alternativa de señalización que no involucra la participación directa de NF- $\kappa$ B pero sí la participación de PAR-1. Los resultados que obtuvimos cuando estimulamos a las células HMEC-1 con trombina, demostraron que, en efecto, la trombina puede cortar y activar al PAR-1 e inducir la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (Anrather, Millan et al. 1997), lo que nos indica que esta es la vía de señalización más descrita actualmente en la activación de genes inflamatorios, sin embargo, cuando infectamos con el IVA pdm (2009) no observamos un evento similar al activado por trombina, pero si generamos un aumento en la presencia de PAR-1 y un aumento en la presencia de citocinas inflamatorias IL-6, IL-8 lo que nos está indicando que posiblemente el IVA pdm (2009) active el proceso inflamatorio y la alteración de la hemostasia a través del PAR-1 pero sin que éste active la vía de señalización en la que NF- $\kappa$ B participa directamente en la expresión de dichos genes inflamatorios.

Como demostramos que I $\kappa$ B $\alpha$  está incrementado en células infectadas, puesto que lo indican los resultados de “western blot”, el IVA H1N1 por sí mismo no induce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  de ser así, la presencia de citocinas inflamatorias entre ellas TNF- $\alpha$ , producidas por otros tejidos (por ejemplo las células del sistema inmunológico)

provocaría un aumento en el FT (como lo reportado) (Nawroth and Stern 1986), pero detrás de éste efecto, mediado por la participación de PAR-1 y su corte proteolítico, debería estar actuando la trombina. Conociendo que el papel de PAR-1 al estar acoplado a las proteínas G y que su activación depende del corte proteolítico ocasionado por la trombina, se realizó un experimento incubando a las células HMEC-1 con trombina para determinar si en efecto ésta ruta es funcional en éste modelo. Los resultados nos indicaron que la señalización desencadenada por trombina si sigue el camino esperado ya que hubo degradación de  $I\kappa B\alpha$  a 1 y 6 horas post infección, así como la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, que se corroboró por los ensayos de inmunocitoquímica (figura 10 y 11 C). Como control positivo se utilizó TNF- $\alpha$  pues se sabe que es un potente inductor de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y desencadena la síntesis de citocinas inflamatorias, lo que podría explicar a lo reportado (Gerondakis, Fulford et al. 2014).

Refiriéndonos a la producción de citocinas inflamatorias, ya se ha reportado que en pacientes con IVA H1N1 y modelos murinos, la infección puede generar la tormenta de citocinas. En nuestro modelo *in vitro* observamos que la degradación de  $I\kappa B\alpha$  no es favorecida por el efecto del IVA H1N1 en las células endoteliales, en nuestro experimento vimos que, lejos de presentar degradación  $I\kappa B\alpha$ , aumentaba según los tiempos de infección de 6 y 24 horas posterior a la estimulación con IVA H1N1. Aunque la síntesis de citocinas inflamatorias no siempre es disparada por la degradación de



I $\kappa$ B $\alpha$  y la consecuente translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo; es un hallazgo importante el encontrar que el IVA H1N1 podría tomar una vía “alterna” que llevaría a la producción de citocinas inflamatorias en endotelio. Como se pudo observar satisfactoriamente en el ensayo de retardo reportado, TNF- $\alpha$  es un potente activador de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y por lo tanto se logró observar la translocación de NF- $\kappa$ B, pues aunque se observa una banda muy tenue en el carril problema de la figura 9 D (HMEC-1 con H1N1 por 20 minutos) no indica una translocación satisfactoria de NF- $\kappa$ B al núcleo.

Ya que la generación de la tormenta de citocinas, tiene relación con el corte de PAR-1, pero este corte es dependiente de trombina la manera en que encontramos que el IVA H1N1 puede contribuir a los procesos de inflamación es mediante el aumento en la cantidad de PAR-1 detectados en los “western blot” a 1 y 6 horas post infección (figura 8 A y B), lo que una vez que se detecten niveles de TNF- $\alpha$  en la célula es posible que el FT sea acomplejado y se active la cascada de coagulación, generando el paso de pro-trombina a trombina y ya que el H1N1 aumenta la cantidad de PAR-1 la trombina es capaz de inducir una señalización amplificada para la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y explicar la alta generación de citocinas inflamatorias.

Ya que la producción de citocinas inflamatorias se presenta en la infección con IVA y es independiente de la translocación de NF- $\kappa$ B al menos en las primeras 24 horas p.i. (por lo demostrado en nuestros experimentos), el incremento en la cantidad de IL's podría generar daño al endotelio por la inflamación como lo reportado en la literatura

(Teijaro, Walsh et al. 2011), este proceso inflamatorio podría exacerbarse provocando la activación del FT que daría paso a la cascada de la coagulación y la activación de la trombina. Bajo esta hipótesis se propone el siguiente esquema, donde se incluye una integración de los resultados presentes en este trabajo (figura 17).

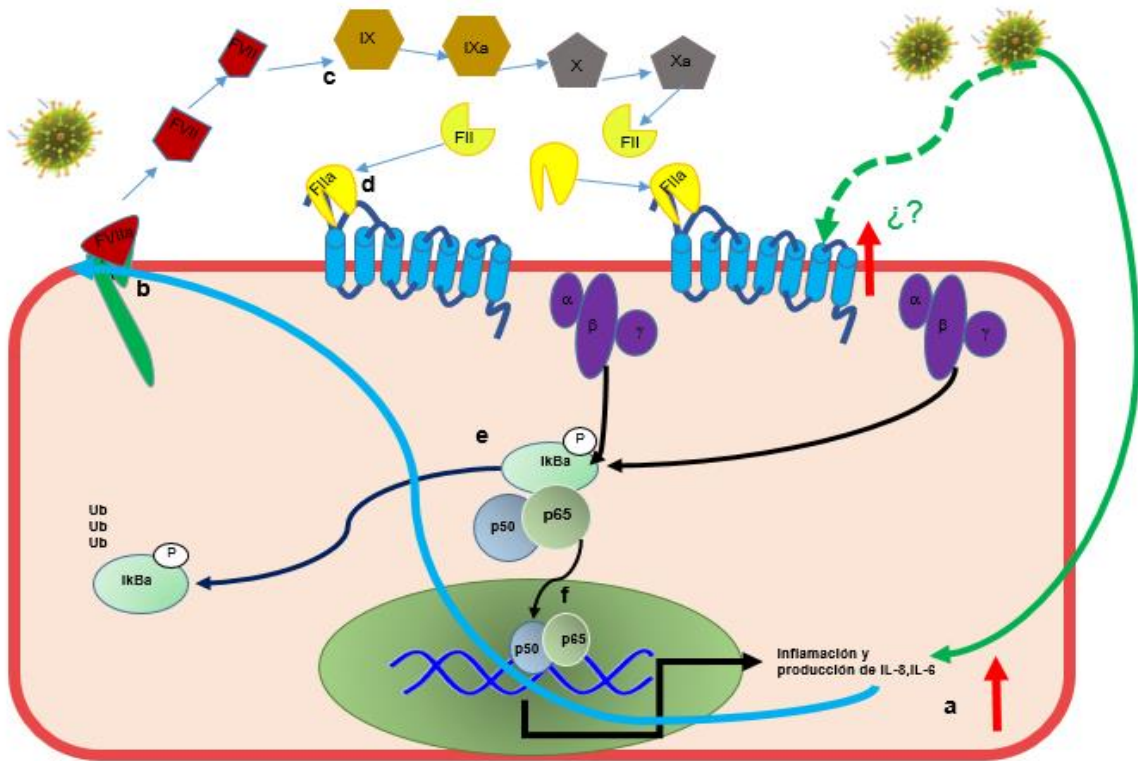


Figura 17) El virus de influenza A en interacción con las células HMEC-1. El IVA, favorece la producción de citocinas inflamatorias como IL-6 e IL-8, propiciando la inflamación y daño a endotelio (a), de esta manera se activaría al FT (b), dando paso a la generación de la cascada de la coagulación, la cual activa a la trombina que corta a PAR-1 (d) para la fosforilación de IκBα y subsecuente degradación (e), permitiendo la translocación al núcleo de NF-κB (f) y aumentando la producción de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, el incremento de PAR-1, aumentaría la producción de citocinas inflamatorias lo cual desencadenaría en daño al endotelio por un proceso de inflamación exacerbada. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual IVA incrementa PAR-1.

## **Conclusiones.**

- Las células HMEC-1 son permisivas a la infección por el virus de Influenza A ya que se demostró que hay síntesis de la proteína viral M1.
- El virus de influenza no induce un aumento en la expresión de Factor Tisular a (1, 6, y 24 horas post infección) en las células HMEC-1.
- El virus de Influenza A no induce la degradación de  $I\kappa B\alpha$  en las células HMEC-1, indicando que la tormenta de citocinas que se asociada con la infección no se debe a la activación directa del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el endotelio.
- La infección de células HMEC-1 con virus de Influenza A indujo un incremento en la cantidad de PAR-1 con un máximo a las 6h post-infección.
- Los resultados anteriores sugieren que la infección con virus de influenza A vuelve susceptibles a las células del endotelio a la acción pro-inflamatoria de la trombina a través de PAR-1 y la consecuente la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo.

## Referencias

- Anrather, D., M. T. Millan, A. Palmethofer, S. C. Robson, C. Geczy, A. J. Ritchie, F. H. Bach and B. M. Ewenstein (1997). "Thrombin activates nuclear factor-kappaB and potentiates endothelial cell activation by TNF." J Immunol **159**(11): 5620-5628.
- Armstrong, S. M., C. Wang, J. Tigdi, X. Si, C. Dumpit, S. Charles, A. Gamage, T. J. Moraes and W. L. Lee (2012). "Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and claudin-5." PLoS One **7**(10): e47323.
- Austin, K. M., L. Covic and A. Kuliopulos (2013). "Matrix metalloproteases and PAR1 activation." Blood **121**(3): 431-439.
- Baumgarth, N. and A. Kelso (1996). "Functionally distinct T cells in three compartments of the respiratory tract after influenza virus infection." Eur J Immunol **26**(9): 2189-2197.
- Bautista, M. V., Y. Chen, V. S. Ivanova, M. K. Rahimi, A. M. Watson and M. C. Rose (2009). "IL-8 regulates mucin gene expression at the posttranscriptional level in lung epithelial cells." J Immunol **183**(3): 2159-2166.
- Bunce, P. E., S. M. High, M. Nadjafi, K. Stanley, W. C. Liles and M. D. Christian (2011). "Pandemic H1N1 influenza infection and vascular thrombosis." Clin Infect Dis **52**(2): e14-17.
- Butenas, S. (2012). "Tissue Factor Structure and Function." Scientifica **2012**: 15.
- Butenas, S., T. Orfeo and K. G. Mann (2008). "Tissue factor activity and function in blood coagulation." Thromb Res **122 Suppl 1**: S42-46.
- Camici, G. G., J. Steffel, A. Akhmedov, N. Schafer, J. Baldinger, U. Schulz, K. Shojaati, C. M. Matter, Z. Yang, T. F. Luscher and F. C. Tanner (2006). "Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents." Circulation **114**(14): 1512-1521.
- Cannell, J. J., R. Vieth, J. C. Umhau, M. F. Holick, W. B. Grant, S. Madronich, C. F. Garland and E. Giovannucci (2006). "Epidemic influenza and vitamin D." Epidemiol Infect **134**(6): 1129-1140.
- Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-264.
- CROSBY, A. W. (2003). America's Forgotten Pandemic The Influenza of 1918.
- Chen, Y. J., L. Q. Zhang, G. P. Wang, H. Zeng, B. Lu, X. L. Shen, Z. P. Jiang and F. P. Chen (2008). "Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells." Thromb Haemost **100**(2): 291-300.

- Cheung, C. Y., L. L. Poon, A. S. Lau, W. Luk, Y. L. Lau, K. F. Shortridge, S. Gordon, Y. Guan and J. S. Peiris (2002). "Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?" Lancet **360**(9348): 1831-1837.
- Chu, A. J. (2005). "Tissue factor mediates inflammation." Arch Biochem Biophys **440**(2): 123-132.
- Chu, A. J. (2006). "Tissue factor upregulation drives a thrombosis-inflammation circuit in relation to cardiovascular complications." Cell Biochemistry and Function **24**(2): 173-192.
- Chu, A. J. (2011). "Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview." Int J Inflamm **2011**: 367284.
- Chung, J., T. Koyama, M. Ohsawa, A. Shibamiya, A. Hoshi and S. Hirosawa (2007). "1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> blocks TNF-induced monocytic tissue factor expression by inhibition of transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B." Lab Invest **87**(6): 540-547.
- Dawood, F. S., A. D. Iuliano, C. Reed, M. I. Meltzer, D. K. Shay, P. Y. Cheng, D. Bandaranayake, R. F. Breiman, W. A. Brooks, P. Buchy, D. R. Feikin, K. B. Fowler, A. Gordon, N. T. Hien, P. Horby, Q. S. Huang, M. A. Katz, A. Krishnan, R. Lal, J. M. Montgomery, K. Molbak, R. Pebody, A. M. Presanis, H. Razuri, A. Steens, Y. O. Tinoco, J. Wallinga, H. Yu, S. Vong, J. Bresee and M. A. Widdowson (2012). "Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study." Lancet Infect Dis **12**(9): 687-695.
- Domingo-Carrasco, C. and J. Gascon-Bustrenga (2005). "[Dengue and other hemorrhagic viral fevers]." Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica **23**(10): 615-626.
- Dominguez-Cherit, G., S. E. Lapinsky, A. E. Macias, R. Pinto, L. Espinosa-Perez, A. de la Torre, M. Poblano-Morales, J. A. Baltazar-Torres, E. Bautista, A. Martinez, M. A. Martinez, E. Rivero, R. Valdez, G. Ruiz-Palacios, M. Hernandez, T. E. Stewart and R. A. Fowler (2009). "Critically Ill Patients With 2009 Influenza A(H1N1) in Mexico." Jama-Journal of the American Medical Association **302**(17): 1880-1887.
- Engelmann, B., S. Zieseniss, K. Brand, S. Page, A. Lentschat, A. J. Ulmer and E. Gerlach (1999). "Tissue factor expression of human monocytes is suppressed by lysophosphatidylcholine." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(1): 47-53.
- Falanga, A., M. Marchetti, S. Giovanelli and T. Barbui (1996). "All-trans-retinoic acid counteracts endothelial cell procoagulant activity induced by a human promyelocytic leukemia-derived cell line (NB4)." Blood **87**(2): 613-617.
- Fineberg, H. V. (2014). "Pandemic preparedness and response--lessons from the H1N1 influenza of 2009." N Engl J Med **370**(14): 1335-1342.
- Fouchier, R. A. M., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen and A. D. M. E. Osterhaus (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." Journal of Virology **79**(5): 2814-2822.

- Furie, B. and B. C. Furie (2008). "Mechanisms of disease: Mechanisms of thrombus formation." New England Journal of Medicine **359**(9): 938-949.
- Gerlach, M., D. Keh, G. Bezold, S. Spielmann, I. Kurer, R. U. Peter, K. J. Falke and H. Gerlach (1998). "Nitric oxide inhibits tissue factor synthesis, expression and activity in human monocytes by prior formation of peroxyxynitrite." Intensive Care Med **24**(11): 1199-1208.
- Gerondakis, S., T. S. Fulford, N. L. Messina and R. J. Grumont (2014). "NF-kappaB control of T cell development." Nat Immunol **15**(1): 15-25.
- Gerrits, A. J., C. A. Koekman, C. Yildirim, R. Nieuwland and J. W. N. Akkerman (2009). "Insulin inhibits tissue factor expression in monocytes." Journal of Thrombosis and Haemostasis **7**(1): 198-205.
- Hamm, H. E. (2001). "How activated receptors couple to G proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 4819-4821.
- Hanasaki, K., A. Varki, I. Stamenkovic and M. P. Bevilacqua (1994). "Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands." J Biol Chem **269**(14): 10637-10643.
- Hayden, F. G., R. Fritz, M. C. Lobo, W. Alvord, W. Strober and S. E. Straus (1998). "Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense." J Clin Invest **101**(3): 643-649.
- Holmes, E. C., E. Ghedin, N. Miller, J. Taylor, Y. M. Bao, K. St George, B. T. Grenfell, S. L. Salzberg, C. M. Fraser, D. J. Lipman and J. K. Taubenberger (2005). "Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses." Plos Biology **3**(9): 1579-1589.
- Huerta-Zepeda, A., C. Cabello-Gutiérrez, J. Cime-Castillo, V. Monroy-Martínez, M. E. Manjarrez-Zavala, M. Gutiérrez-Rodríguez, R. Izaguirre and B. H. Ruiz-Ordaz (2008). "Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART **99**(5): 936.
- Hui, K. P., S. M. Lee, C. Y. Cheung, I. H. Ng, L. L. Poon, Y. Guan, N. Y. Ip, A. S. Lau and J. S. Peiris (2009). "Induction of proinflammatory cytokines in primary human macrophages by influenza A virus (H5N1) is selectively regulated by IFN regulatory factor 3 and p38 MAPK." J Immunol **182**(2): 1088-1098.
- Joseph, U., M. Linster, Y. Suzuki, S. Krauss, R. A. Halpin, D. Vijaykrishna, T. P. Fabrizio, T. M. Bestebroer, S. Maurer-Stroh, R. J. Webby, D. E. Wentworth, R. A. M. Fouchier, J. Bahl, G. J. D. Smith and C. H. N. W. Grp (2015). "Adaptation of Pandemic H2N2 Influenza A Viruses in Humans (vol 89, pg 2442, 2015)." Journal of Virology **89**(8): 4706-4706.
- Joseph, U., Y. C. Su, D. Vijaykrishna and G. J. Smith (2016). "The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission." Influenza Other Respir Viruses.
- Khoufache, K., F. Berri, W. Nacken, A. B. Vogel, M. Delenne, E. Camerer, S. R. Coughlin, P. Carmeliet, B. Lina, G. F. Rimmelzwaan, O. Planz, S. Ludwig and

- B. Riteau (2013). "PAR1 contributes to influenza A virus pathogenicity in mice." J Clin Invest **123**(1): 206-214.
- Korteweg, C. and J. Gu (2008). "Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans." The American journal of pathology **172**(5): 1155-1170.
  - Kumar, N., Z. T. Xin, Y. Liang, H. Ly and Y. Liang (2008). "NF-kappaB signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis." J Virol **82**(20): 9880-9889.
  - Kunieda, Y., K. Nakagawa, H. Nishimura, H. Kato, N. Ukimura, S. Yano, H. Kawano, S. Kimura, M. Nakagawa and H. Tsuji (2003). "HMG CoA reductase inhibitor suppresses the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 induced by angiotensin II in cultured rat aortic endothelial cells." Thromb Res **110**(4): 227-234.
  - Lamb RA, K. R. (2001). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication.
  - Liutov, V. V., V. Rudakov Iu, M. A. Kharitonov, M. K. Shishkin, S. M. Sergeev, L. N. Gribova, V. S. Zasimov and E. K. Krasikov (2013). "[Fatal course of virus-associated pneumonia in patient with influenza A(H1N1)]." Voen Med Zh **334**(3): 32-35.
  - Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter and R. Plevin (2001). "Proteinase-activated receptors." Pharmacol Rev **53**(2): 245-282.
  - Mackie, E. J., C. N. Pagel, R. Smith, M. R. de Niese, S. J. Song and R. N. Pike (2002). "Protease-activated receptors: a means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals." IUBMB Life **53**(6): 277-281.
  - Maugeri, N., G. Giordano, M. P. Petrilli, V. Fraticelli, G. de Gaetano, C. Cerletti, S. Storti and M. B. Donati (2006). "Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug?" J Thromb Haemost **4**(12): 2593-2598.
  - Medina, R. A. and A. Garcia-Sastre (2011). "Influenza A viruses: new research developments." Nature Reviews Microbiology **9**(8): 590-603.
  - Medina, R. A. and A. Garcia-Sastre (2011). "Influenza A viruses: new research developments." Nat Rev Microbiol **9**(8): 590-603.
  - Napoleone, E., A. Di Santo, M. Camera, E. Tremoli and R. Lorenzet (2000). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes." Circ Res **86**(2): 139-143.
  - Nawroth, P. P. and D. M. Stern (1986). "Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor." J Exp Med **163**(3): 740-745.
  - Nobusawa, E., T. Aoyama, H. Kato, Y. Suzuki, Y. Tateno and K. Nakajima (1991). "Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses." Virology **182**(2): 475-485.
  - Osterud, B. and E. Bjorklid (2006). "Sources of tissue factor." Seminars in Thrombosis and Hemostasis **32**(1): 11-23.

- Paessler, S. and D. H. Walker (2013). "Pathogenesis of the Viral Hemorrhagic Fevers." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 8 **8**: 411-440.
- Perez, J. T., A. Varble, R. Sachidanandam, I. Zlatev, M. Manoharan, A. Garcia-Sastre and B. R. tenOever (2010). "Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(25): 11525-11530.
- Petersen, L. C., S. Valentin and U. Hedner (1995). "Regulation of the extrinsic pathway system in health and disease: the role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor." Thromb Res **79**(1): 1-47.
- Potter, C. W. (2001). "A history of influenza." J Appl Microbiol **91**(4): 572-579.
- Renegar, K. B., P. A. Small, Jr., L. G. Boykins and P. F. Wright (2004). "Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract." J Immunol **173**(3): 1978-1986.
- Robertson, J. S. and S. C. Inglis (2011). "Prospects for controlling future pandemics of influenza." Virus Res **162**(1-2): 39-46.
- Runstadler, J., N. Hill, I. T. M. Hussein, W. Puryear and M. Keogh (2013). "Connecting the study of wild influenza with the potential for pandemic disease." Infection Genetics and Evolution **17**: 162-187.
- Russell, R. J., S. J. Gamblin, L. F. Haire, D. J. Stevens, B. Xiao, Y. Ha and J. J. Skehel (2004). "H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes." Virology **325**(2): 287-296.
- Saito, T., T. Koyama, K. Nagata, R. Kamiyama and S. Hirosawa (1996). "Anticoagulant effects of retinoic acids on leukemia cells." Blood **87**(2): 657-665.
- Sidhu, T. S., S. L. French and J. R. Hamilton (2014). "Differential Signaling by Protease-Activated Receptors: Implications for Therapeutic Targeting." International Journal of Molecular Sciences **15**(4): 6169-6183.
- Soslau, G., R. Class, D. A. Morgan, C. Foster, S. T. Lord, P. Marchese and Z. M. Ruggeri (2001). "Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib." J Biol Chem **276**(24): 21173-21183.
- Steffel, J., M. Hermann, H. Greutert, S. Gay, T. F. Luscher, F. Ruschitzka and F. C. Tanner (2005). "Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-jun terminal NH2 kinase phosphorylation." Circulation **111**(13): 1685-1689.
- Steiner, S., W. S. Speidl, J. Pleiner, D. Seidinger, G. Zorn, C. Kaun, J. Wojta, K. Huber, E. Minar, M. Wolzt and C. W. Kopp (2005). "Simvastatin blunts endotoxin-induced tissue factor in vivo." Circulation **111**(14): 1841-1846.
- Szotowski, B., S. Antoniak, W. Poller, H. P. Schultheiss and U. Rauch (2005). "Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines." Circulation Research **96**(12): 1233-1239.
- Tapparelli, C., R. Metternich and N. S. Cook (1993). "Structure and function of thrombin receptors." Trends Pharmacol Sci **14**(12): 426-428.



- Taubenberger, J. K. and J. C. Kash (2010). "Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation." Cell Host Microbe **7**(6): 440-451.
- Taubenberger, J. K. and D. M. Morens (2009). "Pandemic influenza--including a risk assessment of H5N1." Rev Sci Tech **28**(1): 187-202.
- Taubenberger, J. K. and D. M. Morens (2009). "Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1." Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties **28**(1): 187-202.
- Teijaro, J. R., K. B. Walsh, S. Cahalan, D. M. Fremgen, E. Roberts, F. Scott, E. Martinborough, R. Peach, M. B. Oldstone and H. Rosen (2011). "Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection." Cell **146**(6): 980-991.
- Umbach, J. L., H. L. Yen, L. L. M. Poon and B. R. Cullen (2010). "Influenza A Virus Expresses High Levels of an Unusual Class of Small Viral Leader RNAs in Infected Cells." Mbio **1**(4).
- Ungerstedt, J. S., K. Heimersson, T. Soderstrom and M. Hansson (2003). "Nicotinamide inhibits endotoxin-induced monocyte tissue factor expression." J Thromb Haemost **1**(12): 2554-2560.
- van Zoelen, M. A., K. Bakhtiari, M. C. Dessing, C. van't Veer, C. A. Spek, M. Tanck, J. C. Meijers and T. van der Poll (2006). "Ethyl pyruvate exerts combined anti-inflammatory and anticoagulant effects on human monocytic cells." Thromb Haemost **96**(6): 789-793.
- Wang, H. J., H. C. Huang, Y. C. Chuang and H. M. Huang (2008). "Thrombin induces the expression of tissue factor in human aortic endothelial cells." Acta Cardiologica Sinica **24**(3): 151-156.
- Wang, H. Y., Y. M. Yang, Y. Zhuang, H. N. Chen, Y. L. Wan and Y. T. Huang (2007). "The effect of celecoxib on tissue factor expression in pancreatic cancer cells." Chin Med J (Engl) **120**(20): 1753-1756.
- Wei, J. L., H. M. Cui and C. Y. Ma (2007). "Simvastatin inhibits tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients with primary nephrotic syndrome." European Journal of Medical Research **12**(5): 216-221.
- Welliver, T. P., R. P. Garofalo, Y. Hosakote, K. H. Hintz, L. Avendano, K. Sanchez, L. Velozo, H. Jafri, S. Chavez-Bueno, P. L. Ogra, L. McKinney, J. L. Reed and R. C. Welliver, Sr. (2007). "Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses." J Infect Dis **195**(8): 1126-1136.
- Wise, H. M., A. Foeglein, J. C. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay and P. Digard (2009). "A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA." Journal of Virology **83**(16): 8021-8031.
- Zuniga, J., M. Torres, J. Romo, D. Torres, L. Jimenez, G. Ramirez, A. Cruz, E. Espinosa, T. Herrera, I. Buendia, A. Ramirez-Venegas, Y. Gonzalez, K. Bobadilla, F. Hernandez, J. Garcia, F. Quinones-Falconi, E. Sada, M. E.

Manjarrez, C. Cabello, S. Kawa, A. Zlotnik, A. Pardo and M. Selmán (2011). "Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City." Autoimmunity **44**(7): 562-570.