



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO

**“Asociación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β
con la infección *in vitro* por virus Influenza H1N1”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN:

MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:

MVZ. SAMANTHA NÚÑEZ RUEDA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNANDEZ

CO-DIRECTOR:

DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA

CUERNAVACA, MORELOR, MÉXICO A 30 DE MAYO DEL 2022

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN:

- LABORATORIO 13 DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS (UAEM), EN CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.
- DEL MES DE ENERO DEL 2020 A FEBRERO DEL 2022.

COMITÉ TUTORAL:

DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNANDEZ

DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA

DR. MARIO E. CRUZ MUÑOZ

DR. IVÁN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ

DRA. GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL

DRA. DELIA VANNESA LOPEZ GUERRERO

JURADO DE EXAMEN:

DR. JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ

DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ

DR. TOMAS DAVID LOPEZ DIAZ

DRA. HILDA RANGEL FLORES

DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer a mis padres, por su gran apoyo psicológico, emocional y sobre todo su paciencia en estos dos años de la maestría.

A mi abuelita Simplicia, que, aunque ya no este mas con nosotros, siempre tuvo fe en mí, por su cariño y consejos el tiempo que estuvo conmigo, gracias.

Al Dr. Montiel, agradezco infinitamente el que me haya aceptado en su laboratorio ya hace 5 años, que me guiara y apoyara en mi carrera científica, por sus consejos y sobre todo su paciencia; me faltarían palabras para poder expresar lo inmensamente agradecida que estoy, pero lo resumiré en que, lo admiro mucho, se que no cree en el destino, pero estoy feliz de que el destino lo haya puesto en mi camino, agradezco mucho el haberlo conocido, aunque no se lo diga, quiero que lo tenga presente, Le tengo un gran aprecio y que lo quiero mucho.

A la Dra. Judith, por compartirme de sus conocimientos, de su amistad incondicional, su apoyo, paciencia y esas platicas que amenizaban el momento, agradezco mucho el que me aceptara en su laboratorio hace tiempo ya y que me ayudara a crecer como profesionista en el área científico. Agradezco mucho haberla conocido, la quiero mucho.

A el Lic. Alejandro Peña, por su amistad incondicional, esas platicas que alegraban el rato, esos ratos de ser su asistente en la reparación de cositas dentro del laboratorio, chistes y demás, agradezco mucho su apoyo incondicional en todo lo que uno necesitara.

A la Dra. Lourdes Gutiérrez X. perteneciente al CISEI-INSP por su apoyo con el equipo de revelado para Western Blot.

Al Dr. Adolfo perteneciente al CISEI-INSP, por su ayuda en el uso del equipo para el revelado de western Blot.

A mis amigos por su amistad incondicional, sus consejos, sus conocimientos y apoyo incondicional, les agradezco por haber formado parte de mi vida.

“No digas: es imposible. Di: no lo he hecho todavía...”
Proverbio Japonés

ÍNDICE

RESUMEN.....	III
ABREVIATURAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE TABLAS.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Virus Influenza.....	1
1.1.1. Fisiopatología.....	3
1.1.2. Estructura del virus Influenza.....	4
1.1.3. Ciclo de replicación.....	7
1.2. O-GlcNAcilación.....	9
1.2.1. Ruta de biosíntesis de hexosaminas.....	15
1.2.2. Efecto de OGT como sensor de metabolismo.....	16
1.2.3. Efectos fisiológicos de la O-GlcNAcilación.....	18
2. ANTECEDENTES	
2.1. O-GlcNAcilación en patologías e infecciones virales.....	20
2.1.1. O-GlcNAcilación en la infección por el virus Influenza.....	22
2.2. Efecto de TGF- β en infección por virus Influenza.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
5.1. Objetivo General.....	31
5.2. Objetivos Específicos.....	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1. Virus.....	32
6.2. Modelo celular.....	32
6.3. Ensayos de infección <i>in vitro</i> por virus de Influenza.....	32
6.4. Tratamiento con GlcN sobre la infección de Influenza.....	34
6.5. Tratamiento de TGF- β sobre la infección por el virus de Influenza.....	35
6.6. Inhibidores de OGT y OGA.....	35

6.7.	Cuantificación de proteína de lisados celulares.....	36
6.8.	Evaluación de niveles de proteína viral M1.....	37
6.9.	Evaluación de la O-GlcNAcilación.....	40
6.10.	Análisis estadístico.....	41
7.	RESULTADOS	
7.1.	Infección viral <i>in vitro</i>	42
7.2.	Efecto de TGF- β sobre la infección viral por Influenza H1N1.....	43
7.3.	Efecto de la GlcN sobre la infección viral por Influenza H1N1.....	47
7.4.	Efecto del inhibidor OSMI-I sobre la expresión de la proteína viral M1 por infección del virus de Influenza H1N1.....	51
7.5.	Efecto del inhibidor PUGNAc sobre la expresión de la proteína viral M1 por infección del virus Influenza H1N1.....	54
8.	DISCUSIÓN.....	59
8.1.	Efecto del TGF- β sobre la infección viral.....	59
8.2.	Efecto de la O-GlcNAcilación sobre la infección viral.....	63
8.3.	Relación entre TGF- β y O-GlcNAcilación.....	68
8.4.	Limitaciones.....	71
9.	CONCLUSIÓN.....	73
10.	PERSPECTIVAS.....	75
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	76

RESUMEN

La influenza es una enfermedad respiratoria causada por el virus de influenza, siendo los de tipo A los que tienen mayor importancia ya que pueden ocasionar epidemias e incluso pandemias. Es por eso que es importante avanzar en el conocimiento detallado sobre el proceso de infección celular. En ese sentido, la modificación de proteínas citoplasmáticas por adición o remoción de grupos de O-GlcNAc (referido como O-GlcNAcilación) resulta ser un proceso relativamente novedoso en las infecciones virales, debido a sus efectos sobre estas. Existen actualmente varios estudios con diferentes modelos virales pero el papel de la O-GlcNAcilación aún es poco claro, debido a que sus efectos pueden ser muy diferentes dependiendo del virus. Recientemente se evidenció que la estimulación de la biosíntesis de hexosaminas y, por lo tanto, la O-GlcNAcilación incrementa el título viral de la infección por influenza, así como la expresión de citocinas pro-inflamatorias por un mecanismo dependiente de IRF5. Por el contrario, al estudiar sobre células de tipo inmunológico, otro estudio reciente sugirió, que el incremento de la O-GlcNAcilación parece estimular la respuesta antiviral de la célula, por un mecanismo dependiente de interferones tipo I, el cual inhibe la replicación de VIA. Por otro lado, en base a resultados de nuestro grupo de investigación, el TGF- β altera la infección del VIA *in vitro*, bloqueando la apoptosis celular, disminuyendo la replicación viral e inhibiendo la respuesta celular por IL-1b. En ese contexto, este estudio está centrado en evaluar el posible impacto de TGF- β sobre el proceso de O-GlcNAcilación en modelo de células A549 infectadas por el virus Influenza.

HIPÓTESIS. El efecto inhibitorio de TGF- β sobre la infección de células A549 por el virus Influenza se asociará con la O-GlcNAcilación.

OBJETIVO. Evaluar los cambios de O-GlcNAcilación y presencia de proteína viral M1 durante la infección *in vitro* por el virus Influenza con o sin pre-tratamiento con TGF- β o inhibidores selectivos para OGT/OGA.

METODOLOGÍA. Se utilizó la cepa viral H1N1 (New Caledonia, 1999). Como modelo celular se usaron células A549 en medio Advanced-DMEM/F12. Se evaluó la infección viral por ELISA para la proteína viral M1 (protocolo validado en nuestro grupo). La O-GlcNAcilación se evaluó con un anticuerpo monoclonal (clona RL2) por la técnica de western blot y se empleó como control positivo células estimuladas con 10 mM de glucosamina. Los ensayos de infección y pre-tratamiento por TGF- β se realizaron de acuerdo

con el protocolo reportado. Para la inhibición selectiva de OGT se utilizó el reactivo OSMI-1 y para la inhibición selectiva de OGA se utilizó el reactivo PUGNAc. Se realizó estadística descriptiva y para evaluar las diferencias entre grupos se empleó pruebas de ANOVA de dos colas o t de Student, según corresponda al tipo de variable. Todos los ensayos se realizaron por triplicados independientes y los resultados significativos mostraron una $p < 0.05\%$.

RESULTADOS. Inicialmente, el pre-tratamiento con TGF- β indujo un incremento significativo en la expresión de la proteína viral M1, en comparación con la infección sin estimulación. De manera similar, la incubación con GlcN ocasionó un incremento en la expresión de la proteína M1 viral, sin embargo, el tratamiento de TGF- β más GlcN no indujo un incremento suplementario en la expresión de M1. Por su parte, la O-GlcNAcilación se incrementó ligeramente al tratar con TGF- β o GlcN por separado, pero no se alcanzó significancia estadística. Por el contrario, el tratamiento conjunto de TGF- β +GlcN incrementó la O-GlcNAcilación, así como la adición de los inhibidores de OGT u OGA, incrementaron significativamente la proteína M1, en comparación a la infección con el virus. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los efectos entre los inhibidores. Por su parte, la adición de TGF- β a los inhibidores de OGT u OGA indujeron un incremento en los niveles de M1 superiores al tratamiento con TGF- β y sólo con los inhibidores, sugiriendo que el TGF- β altera la O-GlcNAcilación y esto tiene consecuencias sobre la infección viral. Por su parte, el tratamiento combinado de TGF- β más inhibidor de OGT, parece no modificar el efecto del inhibidor, mientras que, por el contrario, el tratamiento de TGF- β en conjunto con el inhibidor de OGA incrementa el efecto estimulador de la O-GlcNAcilación, durante la infección viral. Todo lo anterior sugiere que la O-GlcNAcilación juega un efecto complejo durante la infección viral, dado que su incremento parece favorecer la expresión de la proteína viral M1. Sin embargo, su inhibición no necesariamente coincidió con una disminución de la infección. Por su parte, TGF- β , en estas condiciones en particular, fue un inductor de la infección viral (expresión de M1), pero su efecto sobre la O-GlcNAcilación no fue significativo. Sin embargo, su efecto estimulador se evidenció al sumarse al tratamiento con los inhibidores de OGT y OGA, sugiriendo que TGF- β puede estar involucrada en eventos de O-GlcNAcilación o sus efectos sobre la célula induce un cambio de la infección viral.

CONCLUSIONES. El efecto de TGF- β y la O-GlcNAcilación modifican de manera significativa la infección por VIA al tiempo de 48 horas. Sin embargo, su asociación fue parcial, desde que el efecto del TGF- β o O-GlcNAcilación fue diferente dependiendo de la combinación de los tratamientos. Se sugiere ampliar estos estudios con el fin de reconocer los aspectos biológicamente relevantes entre la citocina, la modificación por glicosilación y la infección viral.

ABREVIATURAS

μ l	microlitros
μ M	microMolar
A549	línea celular derivada de epitelio pulmonar obtenidas de un sarcoma
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid), 2NH ₄
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGMI	GlcNAc fosfomutasa
ANOVA	Prueba estadística...
ATCC	American Type Culture Collection, empresa dedicada al cultivo de líneas celulares
BSL-1	Nivel de Bioseguridad 1
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ac-CoA	Acetil Coenzima A
CREB	Elementos de respuesta a AMPc
CRM1	Chromosome region maintenance 1, también conocido como Exportina 1
CTD	Dominio C terminal en el procedimiento de la O-GlcNAcilación
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de polipéptido
CXCR4	Proteína transmembranal receptora, se presenta en ciertos inmunocitos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM Advanced F12	Dulbecco modified Eagles minimal essential medium
E6	Oncoproteína 6 del virus de papiloma humano
E7	Oncoproteína 7 del virus de papiloma humano
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GFAT	Enzima fructosa-6-fosfato transminasa
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetil glucosamina
Glu	Glutamato
GPI	Fosfoglucoasa Isomerasa
H1N1	Subtipo viral de Influenza
HA	Hemaglutinina

HBP	Vía biosintética de Hexosaminas
HCF-1	Factor Celular 1 del Hospedero
HK	Hexokinasas
HRP	Enzyme horseradish peroxidase – enzima peroxidasa de rabano
hrs	Horas
hpi	Horas Post-Infección
HVSK	Virus asociado a Sarcoma de Kaposi
IBT	Instituto de Biotecnología
IKK α	Subunidad de complejo de proteína-cinasa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
INSP	Instituto Nacional de Salud Publica
IRF5	Factor Regulador de Interferón 5
M1	Proteína viral de matriz del virus de Influenza
M2	Proteína viral de membrana del virus de Influenza
MAP	mitogen-activated protein – proteína activadora mitogenica
MAP3K7	mitogen-activated protein 3 kinase 7
MAVS	Proteína de señal antiviral mitocondrial
MDCK	Células de epitelio de riñón canino
ml	mililitros
mM	miliMolar
MOI	Multiplicidad de Infección en virus
Myd88	Adaptador de la vía canónica de la señal inflamatoria rio abajo de los miembros de TLR e IL-1
NA	Neuraminidasa
NES	Señal de exportación nuclear
NFAT	Factor nuclear de activación de células T
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	Nanogramos
NLS	Secuencia de importación nuclear
nm	Nanómetros

NP	Proteína viral Núcleo proteína de influenza
NS1	Proteína No estructural 1 de influenza
NS2/NEP	Proteína No estructural 2 de influenza – exportación nuclear
N-terminal	Extremo carboxilo terminal de polipéptido
OGA	Enzima O-GlcNAcasa
O-GlcNAc	O-linked β -N-acetylglucosamine
OGT	Enzima O-GlcNAc transferasa
OSMI-I	Inhibidor de la enzima OGT
p65	Factor nuclear NF-kB-p65
PA	Proteasa – proteína viral del virus de Influenza
PB1	Proteína viral polimerasa 1 en influenza
PB2	Proteína viral polimerasa 2 en influenza
PGM3	GlcNAc fosfomutasa
PMA	Phorbol myristate acetate
PPi	Pirofosforilasa
PUGNAc	Inhibidor de la enzima OGA
PVH	Virus del papiloma humano
PVP	Polivinilpirrividona
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteínas
Ser	Serina
SFB	Suero Fetal Bovino
Smad 2/3	Madre contra homologo decantaplejico 2/3
Smad 7	Madre contra homologo decantaplejico 7
Sp1	Factor de transcripción sp1
TAK1	Factor de crecimiento transformador β -activador de cinasa
Tax	Transactivador de pX
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Thr	Treonina
TPCK	6- (1-tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone treated Trypsin

UDP-GlcNAc	Uridil Difosfato N-Acetil Glucosamina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VHS	Virus de Herpes simplex
VHTL-1	Virus linfotrófico de células T humanas 1
VI	Virus de Influenza
VIA	Virus de influenza tipo A
VIH	Virus de Inmunodeficiencia humana
vRNP	Ribo nucleoproteínas virales
WB/Blots	Western Blot

INDICE DE FIGURAS

1. Microscopía electrónica del virus de Influenza A H1N1	4
2. Estructura del virus de Influenza A	5
3. Ciclo replicativo del virus de Influenza	9
4. Esquema general de la modificación postraduccional de proteínas por el grupo O-GlcNAc	10
5. Ciclo de O-GlcNAcilación	11
6. Conversión de glucosa a UDP-GlcNAc (precursor de GlcNAc) es mediado por la vía biosintética de hexosamina	12
7. Relación entre modificación postraduccional de proteínas por O-GlcNAc y por fosforilación de residuos Ser/Thr	13
8. Representación esquemática de la vía biosintética de hexosamina	15
9. Efecto hipotético de O-GlcNAcilación en activación de linfocitos T y B	19
10. La inhibición de la enzima OGT induce un efecto antiviral para la infección por el Herpes virus humano	20
11. Importancia de O-GlcNAcilación durante la infección por el virus Influenza	23
12. La GlcN ayuda a los ratones contra la infección por VIA mediante interferones	24
13. Papel hipotético de la O-GlcNAcilación en base a estudio de Wang y cols.	24
14. Efecto de la inhibición de la enzima OGT durante la infección por virus Influenza H1N1 <i>in vitro</i>	25
15. El perfil de O-GlcNAcilación se incrementa en células infectadas por Virus Influenza A H1N1	26
16. Modelo experimental de Infección por Influenza A H1N1 con tratamiento de TGF- β 27	
17. Pretratamiento con TGF- β 1 inhibe la expresión de M1 y la replicación viral en células A549	28
18. Esquema experimental de la infección por el virus de Influenza A H1N1.	33
19. Esquema experimental de la infección por el virus de Influenza A H1N1 con tratamiento de TGF- β y GlcN.	33
20. Esquema experimental de la infección por el virus de Influenza A H1N1 con los inhibidores OSMI-I y PUGNAc.	36
21. Estandarización de la expresión de la proteína M1 por ELISA	38

22. Esquema de la colocación de los lisados obtenidos para ELISA	39
23. Niveles comparativos de M1 entre células infectadas por VIA y células sin infectar (Control)	42
24. Efecto del tratamiento por TGF- β sobre la infección por VIA	44
25. Efecto del tratamiento independiente y conjunto de TGF- β e infección por VIA sobre la O-GlcNAcilación	45
26. Efecto del tratamiento con GlcN sobre la infección por VIA	47
27. Efecto de co-tratamiento de TGF- β y GlcN sobre la infección viral	48
28. Efecto del tratamiento independiente y conjunto de GlcN y TGF- β sobre la O-GlcNAcilación durante infección por VIA	50
29. Efecto del inhibidor OSMI-I sobre infección por VIA con o sin tratamiento con TGF- β	51
30. Efecto del inhibidor OSMI-I sobre la O-GlcNAcilación en infección por VIA con o sin tratamiento con TGF- β	52
31. Efecto del Inhibidor PUGNAc ante infección por VIA con o sin tratamiento con TGF- β	54
32. Efecto de los inhibidores OSMI-I/PUGNAc sobre la infección por virus Influenza	56
33. Efecto de Inhibidor PUGNAc y TGF- β sobre la O-GlcNAcilación ante infección por VIA	57
34. Esquema de la conclusión del trabajo de maestría	72

INDICE DE TABLAS

I.	Diferencias sintomáticas entre resfriado e influenza	2
II.	Expresión de las diferentes proteínas virales	6
III.	Reconocimiento del fenómeno asociado con la glicosilación de O-GlcNAc	17
IV.	Comparación entre los procesos de infección de 3 diferentes autores	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus Influenza

La influenza es una enfermedad respiratoria contagiosa provocada por los virus de Influenza (VI), pertenecientes a la familia de *Orthomyxoviridae*, los cuales son virus ARN de cadena simple y polaridad negativa dividida en 8 segmentos para los tipo A y B y en 7 para los tipo C, son virus envueltos y estos se replican en el núcleo celular. Dentro de esta familia se encuentran siete géneros: los tipos A, B, C y D del virus Influenza, los *Thogotovirus* (infectan insectos), los *Isavirus* (infectan peces) y los *Quararjavirus*. Los virus de Influenza tipo A y B son los que generalmente se encuentran diseminados entre los humanos y algunas especies animales y que, todos los años, causan epidemias de influenza estacional y, en ocasiones, han producido pandemias. Por su parte, los tipos C infectan a humanos y cerdos, pero causan enfermedades respiratorias moderadas y han sido poco estudiados (Arias y López, 2009), mientras que los tipo D del virus Influenza afectan principalmente al ganado y no se cree que puedan causar infecciones o enfermedades en los seres humanos (CDC, 2021). La elevada capacidad de estos virus para generar variantes antigénicas ha permitido definir la influenza como una enfermedad constante causada por virus siempre variables (Ortín, 2009).

A su vez, el virus de Influenza A (VIA) se clasifica en numerosos subtipos, en función de la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Existen 18 diferentes subtipos de HA y 11 de NA y el subtipo de cada virus se define por la combinación de la HA y la NA que contiene, por lo que la diversidad antigénica es muy amplia.

Por su parte, la infección en humanos provoca manifestaciones clínicas importantes, que en algunos casos puede presentar complicaciones de las vías aéreas, requiriendo su hospitalización y provocando, en un porcentaje menor, la muerte del paciente. La población más susceptible son las personas mayores, niños pequeños y personas con ciertas afecciones en la salud como diabetes o cardiopatías, entre otras, estas son las que corren más riesgo de padecer la enfermedad y tener graves complicaciones (CDC, 2021).

La elevada variabilidad de los virus de influenza, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de huésped, han hecho de ellos uno de los patógenos que más mortalidad

han tenido en el siglo XX, entre 40 y 100 millones de decesos sólo tomando en cuenta las pandemias de 1918, 1957, 1968 y 1977 (CDC, 2021).

La propagación del virus de influenza se da por medio de aerosoles que viajan por el aire, las cuales se producen al toser, estornudar o hablar, y que pueden ser inhaladas o ingeridas por otras personas o animales que están expuestos, posibilitando que la infección viral se propague de manera exponencial. Aunque las personas con Influenza son más contagiosas durante los primeros tres o cuatro días después de la aparición de los síntomas (etapa de viremia), la mayoría de los adultos infectados pueden contagiar a otros desde un día antes de la aparición de síntomas aparezcan y hasta 5-7 días después del inicio de la enfermedad, incrementando la probabilidad de infección. Niños y algunas personas con el sistema inmunitario debilitado pueden diseminar el virus por más de 7 días. (CDC, 2021), (Ortín, 2009).

Tabla I. Diferencias sintomáticas entre resfriado e influenza. Tomado de <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/index.html>.

El resfriado vs. la influenza		
Signos y síntomas	Resfriado	Influenza (gripe)
Comienzo de los síntomas	Gradual	Repentino
Fiebre	Poco frecuente	Normal; dura 3 a 4 días
Dolores	Leve	Habitual; a menudo intenso
Escalofríos	Poco común	Bastante común
Fatiga, debilidad	A veces	Normal
Estornudo	Común	A veces
Incomodidad en el pecho, tos	Leve a moderado; tos áspera	Común; puede ser intenso
Nariz tapada	Común	A veces
Dolor de garganta	Común	A veces
Dolor de cabeza	Poco frecuente	Común

La enfermedad cursa con diferentes síntomas y es importante conocer las diferencias entre el resfriado común y la influenza, para poder dar un diagnóstico certero y pronto tratamiento (Tabla I). Por su parte, para el tratamiento de la Influenza se recomiendan medicamentos antivirales, tales como los inhibidores de la bomba de protones en endosomas o inhibidores de neuraminidasa. El efecto de estos medicamentos pueden aliviar los síntomas o acortar la duración de la enfermedad, sin embargo, es muy importante la consulta con el médico para poder realizar un diagnóstico correcto, así como el tratamiento farmacológico más adecuado para cada caso. A pesar de contar con cada vez un mejor arsenal farmacológico contra Influenza, la mejor manera de prevención sigue siendo la vacunación anual (CDC, 2021; Ortín, 2009).

1.1.1. Fisiopatología

El periodo de incubación de la influenza transcurre desde la exposición al virus hasta el inicio de los síntomas, período que varía desde el día 1 al 4, esto dependiendo de la carga viral a la cual se estuvo expuesta el paciente (CDC, 2021; Taubenberger and Morens, 2007; Secretaria de Salud, 2015). La influenza cursa con fiebre alta, tos, dolor de cabeza, mialgias, dolor e irritación de la garganta, secreción nasal, malestar e inflamación en vías respiratorias. En casos más severos llega a desarrollarse neumonía y edema pulmonar, pudiendo causar la muerte del paciente. Los síntomas agudos y la fiebre usualmente persisten de 7 a 10 días. La laringotraqueitis puede ser una complicación grave en niños pequeños. Por su parte, en personas con compromiso pulmonar o cardiaco, con comorbilidades tales como diabetes mellitus, insuficiencia renal e hipertensión, parecen presentar mayor riesgo para el desarrollo de complicaciones severas como consecuencia de la infección del virus de influenza, lo cual puede incluir bronquitis hemorrágica, neumonía y la muerte (Zambon, 2001; Secretaria de Salud, 2015). Por su parte, la neumonía fatal fulminante por influenza viral ocurre asociada con disnea, cianosis, hemolisis, edema pulmonar; pudiendo ocurrir esto en de las primeras 48 horas después de la manifestación de los síntomas (Herold, 2015).

El virus de Influenza infecta y se replica principalmente en las células de todo el epitelio del árbol respiratorio, por lo cual es común que se presenten síntomas de faringitis y

traqueobronquitis. Así, los primeros sitios de replicación de la Influenza ocurren en el epitelio de la tráquea, bronquios y alveolos pulmonares. También pueden presentarse infecciones bacterianas secundarias en el paso aéreo, lo cual incrementa las complicaciones de la patología. En los casos agudos hay destrucción multifocal, citonecrosis, fibrosis y descamación del epitelio pseudoestratificado columnar de la tráquea y bronquios, esto pudiendo derivar en la formación de edema, congestión en la submucosa y metaplasia escamosa (Secretaría de Salud, 2015). En casos severos de la infección por Influenza, el epitelio pulmonar pierde su estructura y los alveolos su forma. El intersticio puede mostrar congestión, edema e infiltración inflamatoria, mientras que los espacios aéreos pueden estar saturados con edema, fibrina y presencia masiva de neutrófilos; debido a esto ocurre una obstrucción en las vías respiratorias lo cual puede llevar a la muerte (Herold, 2015).

1.1.2. Estructura del virus Influenza

Las partículas del virus influenza (VI) son, en general, pleomórficas, de forma esférica y con un diámetro entre 80 y 120 nm (Figura 1). En la bicapa lipídica se encuentran tres proteínas de membrana: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y la proteína M2. Las proteínas HA y NA son abundantes, siendo la HA la de mayor presencia en la membrana, mientras que la proteína M2 está presente sólo en pocas copias por virus.

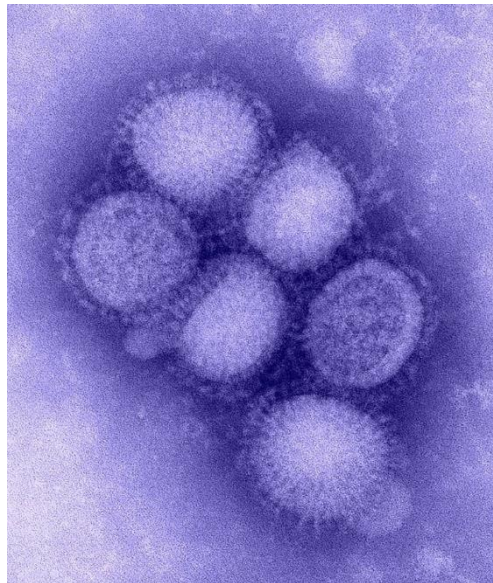


Figura 1. Microscopia electrónica del virus de Influenza A. Tomado de: https://www.cdc.gov/h1n1flu/images.htm?s_cid=cs_001

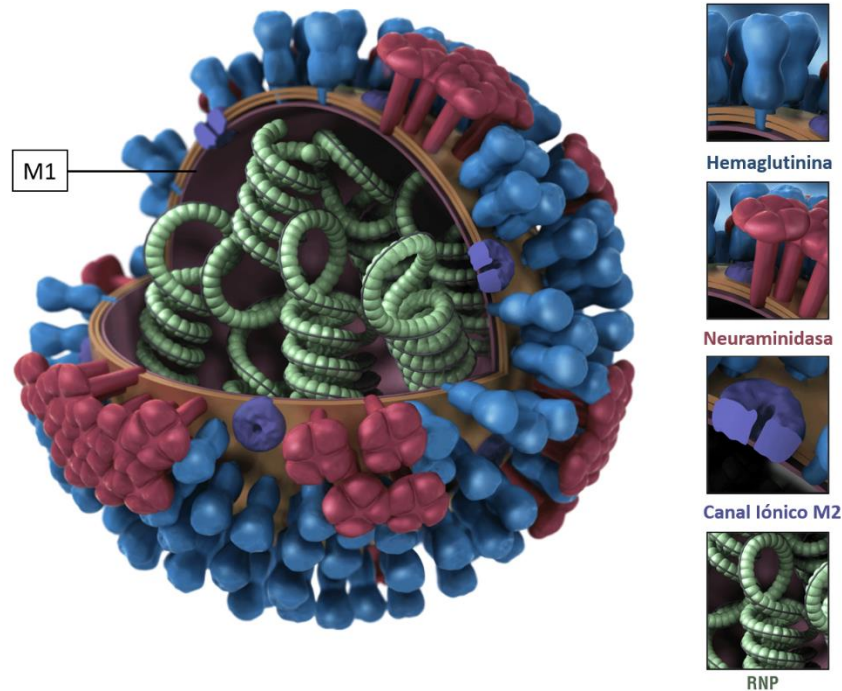


Figura 2. Estructura del virus de Influenza A. Estos son clasificados por subtipos según las propiedades a las proteínas en su superficie: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA). Existen 18 subtipos diferentes de HA y 11 subtipos de NA. Los subtipos se designan mediante la combinación de las cantidades de HA y NA. Tomado de: <https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>

Las proteínas HA y NA están glicosiladas con modificaciones de tipo N-glicosídico, pero se desconoce si la proteína M2 contiene glicosilación (Ortín, 2009). Como se menciona en la Tabla II, mientras que la proteína HA es responsable de unirse al receptor celular el cual se caracteriza por portar residuos de ácido siálico, la NA se encarga de escindir estos residuos para que los nuevos viriones puedan liberarse de la membrana celular y, por lo tanto, propagar la infección hacia células vecinas. Por su parte, la proteína M2 constituye un canal iónico que permite el paso de los protones al interior del virus, acidificando su interior y permitiendo la liberación de sus ribonucleoproteínas virales (vRNP) junto con su material genético en el citoplasma celular (Ortín, 2009).

Tabla II. Expresión de las diferentes proteínas virales. Tomado de (Ortín, 2009).

<i>Segmento</i>	<i>Longitud</i> ¹	<i>Proteína</i>	<i>Tamaño</i> ²	<i>Abundancia</i> ³	<i>Funciones</i>
1	2.341	PB2	759	30-40	Proteína de unión a cap. Iniciación de transcripción
2	2.341	PB1 PB1-F2	757 87	30-40	Polimerasa Unión a la mitocondria. Apoptosis
3	2.233	PA	716	30-40	Proteasa. Replicación
4	aprox. 1.770	HA	aprox. 566	500	Hemaglutinina. Unión al receptor. Proteína de fusión. Respuesta inmune
5	1.565	NP	498	1.000	Proteína de la nucleocápsida. Replicación. Encapsidación
6	aprox. 1.413	NA	aprox. 454	100	Neuraminidasa. Destrucción del receptor. Respuesta inmune
7	1.027	M1	252	3.000	Unión de la nucleocápsida a la membrana
8	890	M2	96	50	Canal jónico. Fusión de las membranas
		NS1	aprox. 230	—	Modulación de la expresión génica. Virulencia
		NS2	121	50	Exportación de la nucleocápsida del núcleo

¹ Longitud en nucleótidos. ² Tamaño en aminoácidos. ³ Abundancia en la partícula viral.

Por otro lado, debajo de la membrana lipídica se encuentra la proteína M1, la cual forma una capa proteica que protege las ribonucleoproteínas del virus (Figura 2). La proteína M1 es uno de los factores importantes para la formación de las nuevas partículas virales. Después de la proteína M1 se encuentra el genoma viral el cual está constituido por 7 segmentos de RNA para los virus tipo C y 8 segmentos para los tipos A y B (Cheung y Poon, 2007). Cada uno de ellos se encuentra asociado con el complejo de polimerasas, las proteínas “PB1, PB2 y PA” y con monómeros de la NP, formando lo que se denominan ribonucleoproteínas (RNPs) virales (Ortín, 2009).

Ajenas a la estructura del virus, durante la infección celular, se expresan las proteínas NS1 y NS2/NEP (Proteína de exportación nuclear) en el segmento 8, la cual interacciona con la proteína M1, La proteína NS1 se expresa al inicio de la infección viral, momento en el cual se localiza en el núcleo, pero más tarde se localizará en el citoplasma celular. La proteína tiene dos secuencias para su transporte al núcleo (NLSs) localizadas en las regiones N- y C- terminal de la proteína, además de que presenta una señal de exportación nuclear (NES). Se sugiere que esta proteína tiene varios tipos de interacciones con factores

virales y celulares, al tiempo que también es capaz de unirse a las RNP virales en la célula infectada pero no de la partícula viral. Cabe mencionar que esta proteína no forma parte de la estructura viral de ahí su nombre Non Structural o NS. Debido a sus múltiples interacciones celulares, se asume que NS-1 desempeña diversas funciones que controlan la respuesta antiviral de las células, la muerte celular. La proteína NS2/NEP se localiza en el citoplasma y núcleo, donde interacciona con nucleoproteínas y con el factor de exportación nuclear (CRM1). Esta proteína se consideraba no estructural ya que no forma parte de la estructura viral, pero se ha demostrado que está presente en la partícula viral en asociación con la proteína M1, regulando la exportación nuclear de los RNAs de los viriones utilizando la maquinaria de exportación nuclear de la célula. (Ortín, 2009; O'Neill, Talón y Palese, 1998).

Al final, las ribonucleoproteínas permiten la expresión de al menos 11 proteínas virales de los virus de Influenza tipo A, a partir de los 8 segmentos de ARN, lo cual permite realizar todas las actividades que el virus requiere como: generar la proteína M1, la síntesis de nuevos ARNs (PB1, PB2 y PA), la propagación en infección de nuevas células, entre otros varios eventos (Ortín, 2009; Cheung, 2007).

1.1.3. Ciclo de replicación

Como se muestra en la Figura 3, el ciclo replicativo viral involucra una serie de pasos, los cuales inician cuando el virus se adhiere a las células blanco por el reconocimiento de los residuos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular, por complejos trimétricos de HA. Mientras la adhesión de todos los virus de influenza tipo A requieren de ácido siálico las cepas varían en sus afinidades por diferentes sialigosacáridos. Por ejemplo, en cepas de virus humanos se unen preferentemente a ácidos siálicos para galactosa por una unión $\alpha 2,6$, el ácido siálico de mayor presencia en el epitelio respiratorio humano. Las cepas de virus aviáres se unen preferentemente a ácidos siálicos con unión a galactosa por una unión $\alpha 2,3$, este tipo de ácido siálico está presente mayormente en el epitelio intestinal de pato. (Flint, 2015). Posteriormente, los virus adsorbidos en la membrana celular entran mediante endocitosis. A continuación, la proteína M2 la cual es una proteína transmembranal, que forma tetrámeros, cuyos dominios transmembranales forman

un canal el cual actúa como un canal iónico selectivo de protones. La apertura de los canales iónicos de M2 acidifica el núcleo viral lo cual permite que el entorno se torne ácido en el virión que ayudará a liberar la vRNP de M1, de tal manera que la vRNP queda libre para poder entrar en el citoplasma de la célula huésped (Samji, 2009); lo cual, a su vez, permitirá que la VRNP sean transportadas rápidamente al núcleo celular por la proteína NP y las subunidades de la polimerasa ya que contienen señales de transporte al núcleo.

Una vez que las proteínas NP y las polimerasas están dentro del núcleo inicia la replicación del genoma viral, el cual consistirá en el empleo del molde de ARN de polaridad negativa para la generación del ARN de polaridad positiva. Una vez terminado, este saldrá del núcleo y permitirá la síntesis de proteínas virales asociadas a retículo endoplasmático. Por otro lado, una parte del ARN de polaridad positiva servirá como molde para la generación de nuevas moléculas de ARN negativo, el cual constituirá el material genético de las nuevas partículas virales. Posteriormente, las proteínas de nucleocápside formarán un complejo con los segmentos de ARN los cuales serán dirigidos a la membrana celular, donde se reunirán con el resto de las proteínas virales como: M1, M2, PB1, PB2, PA, HA y NA; permitiendo así, el ensamblaje de las nuevas partículas virales. Finalmente, la NA se encargará de eliminar los residuos de ácido siálico presentes en la membrana celular, permitiendo que los nuevos virus no sean retenidos por estos residuos de la célula infectada y serán liberados para poder infectar otras células (Ortín, 2009; Taubenberger and Morens, 2008).

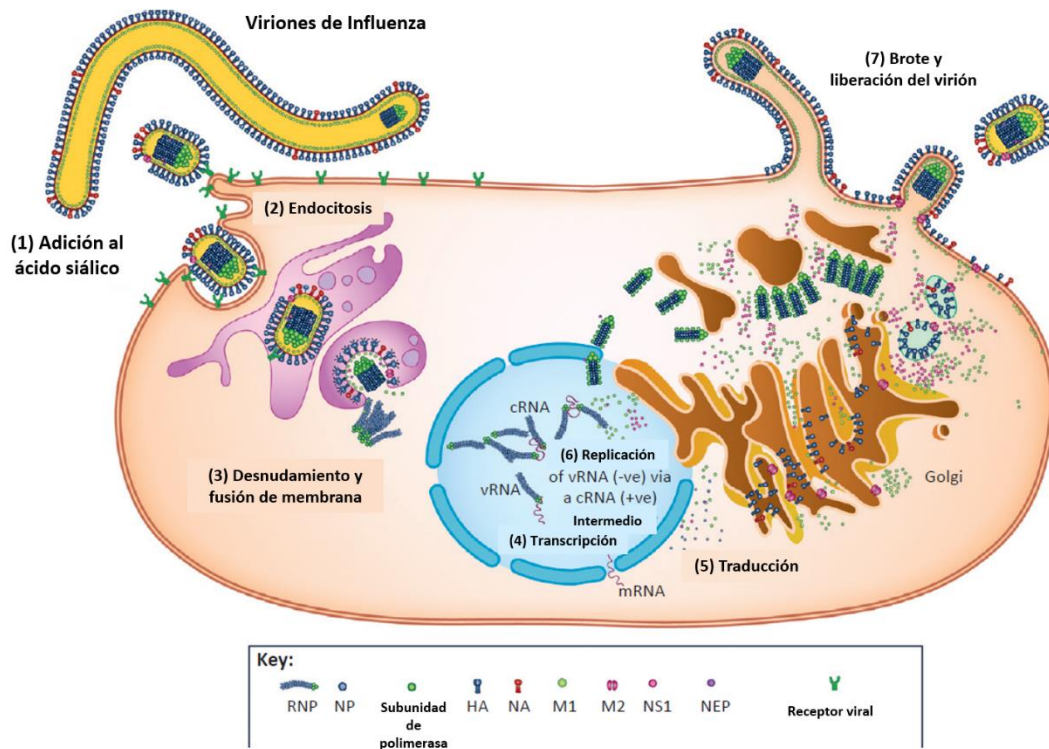


Figura 3. Ciclo replicativo del virus de influenza. Se muestran 7 pasos los cuales describen como se replica el virus de influenza, iniciando con el reconocimiento del receptor celular por parte del receptor viral, hasta la liberación de los nuevos viriones, donde también se pueden observar la participación de las diferentes proteínas virales. Tomado de Hutchinson, 2018.

1.2. O-GlcNAcilación

A diferencia de la mayoría de los tipos de glicosilación cuyos efectos directos se observan en el espacio extracelular, se reconoce que algunos tipos de glicosilación parecen tener una participación muy activa dentro de las células, tal es el caso de la O-glicosilación por el grupo GlcNAc. En la década de 1980, Torres y Hart describieron una nueva modificación en las proteínas citoplasmáticas y nucleares caracterizada por el acoplamiento de un monosacárido conocido como GlcNAc a los residuos Ser o Thr del esqueleto polipeptídico lo cual fue confirmado por estudios posteriores (Wells, 2003; Kudlow, 2006).

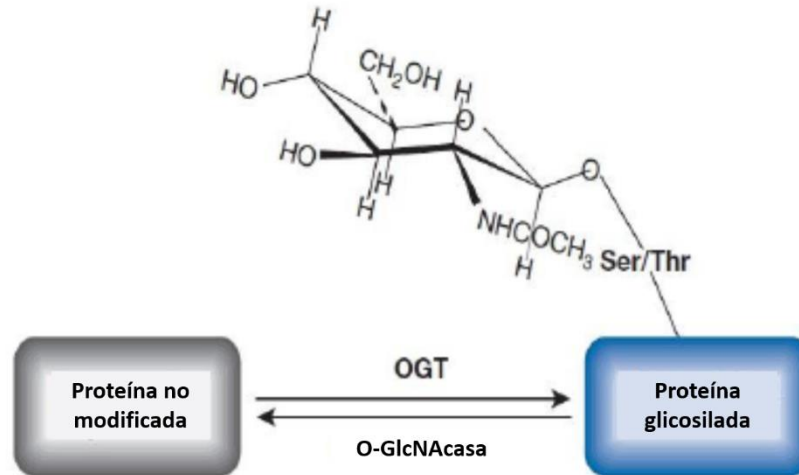


Figura 4. Esquema general de la modificación postraduccional de proteínas por el grupo O-GlcNAc. N-acetilglucosamina es añadido a residuos de serina y treonina de proteínas blanco por la enzima OGT, mientras que es cortado por la enzima OGA. Tomado de Zachara and Hart, 2022.

Actualmente se reconoce que, dentro de los compartimentos subcelulares, las proteínas pueden ser glicosiladas por modificación específica y dinámica en los residuos Serina o Treonina, por medio de una unión tipo O-ligando, donde el grupo carbohidrato lo constituye el monosacárido N-acetilGlucosamina (O-GlcNAc), como se describe en la Figura 2 (Wang and Hart, 2008; Zachara and Hart, 2002).

Esta modificación postraduccional, comúnmente denominada como “O-GlcNAcilación”, se ha observado principalmente en las células eucariotas que han sido evaluadas en respuesta a estímulos celulares, tal como la presencia de oxígeno, niveles de glucosa, etc. (Hanover, 2012). La variedad de proteínas modificadas por O-GlcNAcilación es muy amplia, dentro lo cual se incluyen a la RNA polimerasa II y diversos factores de transcripción, oncoproteínas, proteínas del citoesqueleto, de vías de señalización y de la síntesis de proteínas y traducción, entre muchas otras (Lefebvre and Issad, 2015; Zachara and Hart, 2006). Debido a la diversidad de polipéptidos sujetos a este tipo de glicosilación que se sugiere que las proteínas modificadas por O-GlcNAc son moduladores claves en la señalización celular.

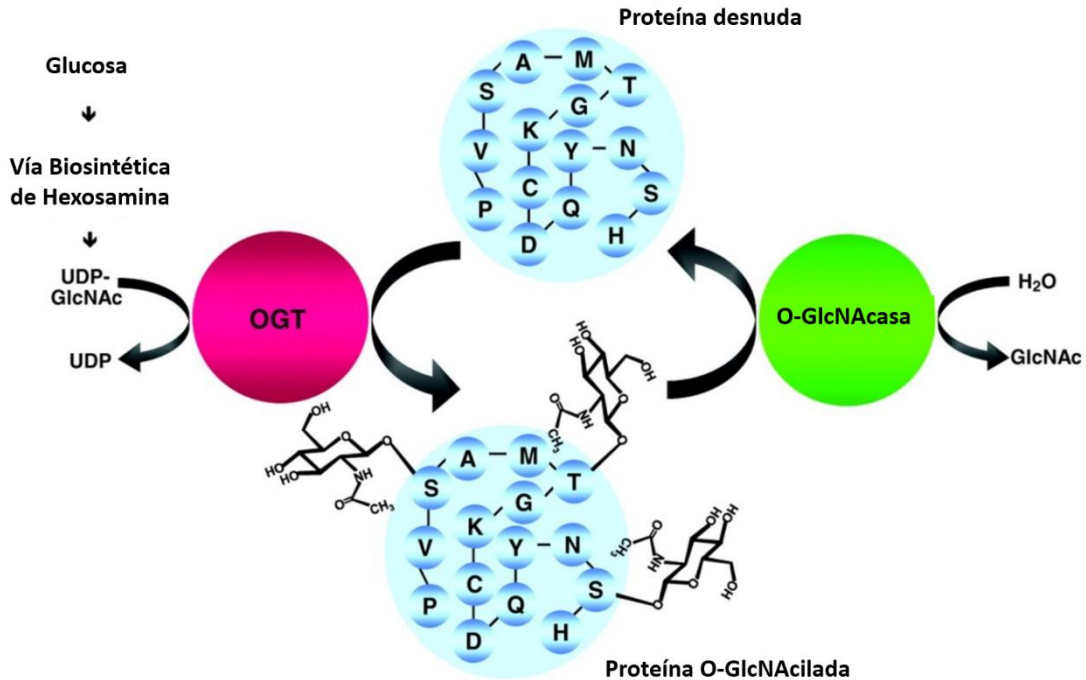


Figura 5. Ciclo de O-GlcNAcilación. La glucosa es metabolizada por una vía biosintética de hexosamina para la forma de gran energía intermediada por UDP-GlcNAc, la cual sirve como el donador de azúcar para OGT. El ciclo de O-GlcNAc inicia cuando OGT cataliza la transferencia de GlcNAc desde UDP-GlcNAc hacia los residuos de serina y/o treonina de un sustrato de proteína. Mientras que la O-GlcNAcase hidroliza la unión glicosídica para generar GlcNAc libre y una proteína libre. Imagen tomada de: Journal of Cell Science: <http://jcs.biologists.org/content/123/1/13>.

La “O-GlcNAcilación” depende del balance de dos enzimas con funciones opuestas, como se muestra en la Figura 5: por un lado, la O-N-acetilglucosaminiltransferasa, denominada O-GlcNAc transferasa (OGT), la cual adiciona los grupos GlcNAc, y, por el otro lado, la enzima β-N-acetilglucosaminidasa, denominada O-GlcNAcase (OGA), la cual elimina este grupo (Zachara and Hart, 2002).

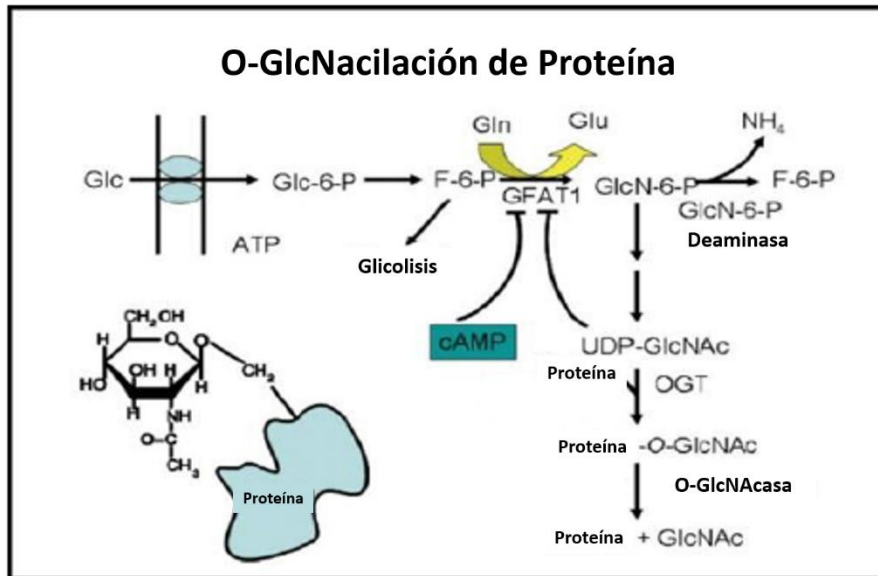


Figura 6. Conversión de glucosa a UDP-GlcNAc (precursor de GlcNAc) es mediado por la vía biosintética de la hexosamina. La glucosa entra a la célula a través del transportador de glucosa y ATP, y es consumida a Glucosa-6-fosfato por acción de la hexoquinasa. La glucosa fosforilada se isomeriza a Fructosa-6-fosfato (F-6-P). Hasta el 5% de F-6-P es convertida a Glucosamina-6-fosfato por GFAT, finalmente la glucosamina es acetilada para producir UDP-GlcNAc, donde una parte es utilizada por OGT para la modificación de proteínas. Tomado de Kudlow, 2006..

Se reconoce que O-GlcNacilación es una modificación reversible y puede modificarse en respuestas a eventos tales como el estrés celular y estímulos extracelulares. Sin embargo, hay que considerar que la actividad de la enzima OGT depende del contenido de su sustrato (UDP-GlcNAc) en el citosol que posteriormente se transportara a Golgi (Levine and Walker, 2016). A este respecto, se sugiere que el 3% del total de glucosa se destina a la síntesis de UDP-GlcNAc por la vía biosintética de la hexosamina, Figura 6 (Kudlow, 2006). Por lo cual se considera que la O-GlcNacilación además de permitir la regulación de múltiples funciones intracelulares, es un sensor de los niveles de glucosa y que su concentración depende del estado metabólico de la célula (Sharma, 2017; Machacek, 2018). Esto debido al hecho de que el aumento o reducción en la concentración de UDP-GlcNAc afectará la transferencia de grupos GlcNAc por parte la enzima OGT hacia los residuos de serina y treonina de las proteínas blanco, causando con ello la regulación de diversas vías de señalización como consecuencia de metabolismo celular (Zachara and Hart, 2006; Hart, 2011).

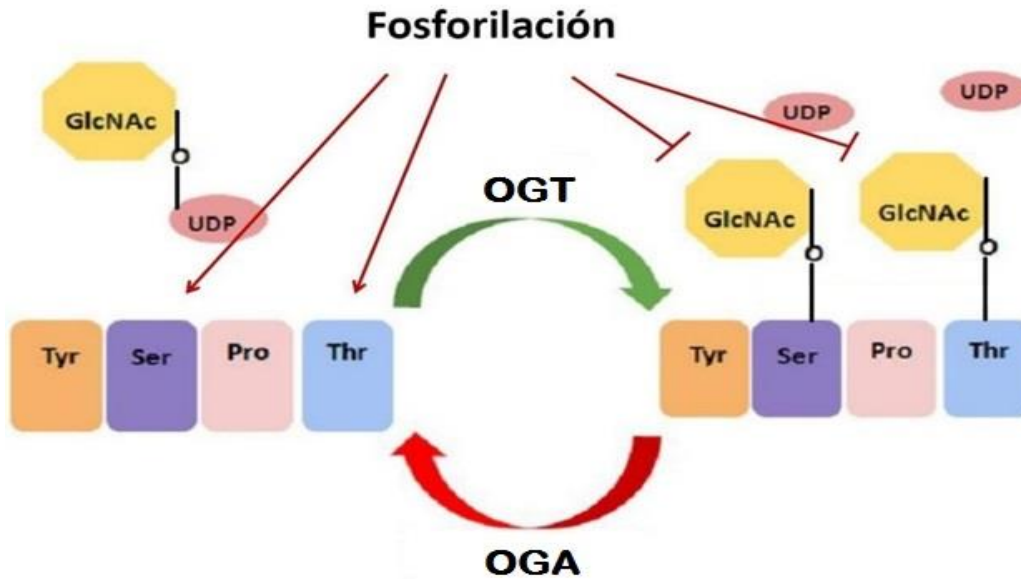


Figura 7. Relación entre modificación postraduccional de proteínas por O-GlcNAc y por fosforilación de residuos Ser/Thr. El grupo GlcNAc se une por acción de la OGT en residuos de serina/treonina, mientras que este grupo es cortado por la acción de la OGA. Mientras tanto, la fosforilación puede competir por los mismos sitios, mediante la acción de proteínas cinasas. Tomado de Golks, 2007.

Interesantemente, la O-GlcNAcilación comparte rasgos comunes con la regulación por fosforilación de actividad de proteínas, ya que, como ella, implica la participación de enzimas para llevar a cabo procesos dinámicos y modificaciones específicas. Mientras que la fosforilación (adición de fosfatos) implica la actividad de enzimas conocidas como cinasas, la O-GlcNAcilación implica la actividad de la enzima OGT. Por su parte, la remoción del grupo fosfato se lleva a cabo por la acción de las enzimas fosfatasas, mientras que la eliminación del grupo O-GlcNAc implica la activación de la enzima OGA. Estudios recientes sugieren que la O-GlcNAcilación interacciona fuertemente con los eventos de regulación por fosforilación, dado que ambos tipos de modificación postraduccional requieren los residuos de Ser y Thr de las proteínas blanco (Figura 7). En este sentido, se sugiere que ambas modificaciones pueden competir por el mismo sitio y, por tanto, alterarse mutuamente (Zachara and Hart, 2006; Mishra, 2011).

Actualmente, la modificación de proteínas por O-GlcNAc ha sido estudiada en una gran variedad de factores de transcripción, entre los cuales se encuentran Sp1 (Kudlow, 2006; Issad and Kuo, 2008; Jochmann, 2009), NFAT (Samji, 2009) y NFkB (Golks, 2007), Issad and Kuo, 2008; Xing, 2011; Baudoin and Issad, 2015). En este último caso, estudios

realizados con el dímero p65 sugieren que su modificación por O-GlcNAc interfiere con la unión de ADN y disminuyen su capacidad de transactivación y su efecto para inducir la expresión de TNF- α (Baudoin and Issad, 2015). También se ha reportado que altos niveles de O-GlcNAc en el factor de transcripción Sp1 puede bloquear su unión al DNA y, consecuentemente, favorecer la transcripción (Xing, 2011). Por otro lado, Roos et al. sugirieron que la O-GlcNAc en Sp1 permite, por otra parte, su interacción con el complejo de proteínas que forman el poro nuclear y se sugiere que esta interacción pueda favorecer la translocación nuclear (Roos, 1997). Por otra parte, otros estudios han propuesto que el complejo de poro nuclear, compuesto por diversas proteínas, puede, a su vez, ser modificado por O-GlcNAc, por lo que se ha sugerido que esta modificación podría facilitar el transporte nuclear (Comer and Hart, 1999).

Otra proteína modificada por O-GlcNAc es la ARN polimerasa II, en su Dominio C-Terminal (CTD). Se conoce que el CTD regula las interacciones proteína-proteína durante las fases de la transcripción: iniciación, elongación y el procesamiento del mRNA. En este sentido, se ha observado que CTD es fosforilado en la Ser 2 y Ser 5 durante las dos últimas fases de la transcripción; sin embargo, la iniciación de la transcripción no depende de un proceso de fosforilación por lo que se ha sugerido que O-GlcNAc juega un papel clave para inhibir la fosforilación durante el inicio de la transcripción. Así mismo, se ha observado que la fosforilación del CTD conlleva a que ya no pueda llevarse a cabo la O-GlcNAc de dicho dominio. Por el contrario, la modificación por O-GlcNAc del mismo CTD puede impedir que se lleve a cabo la fosforilación, por lo que se ha considerado un elemento clave en el posible control sobre la maquinaria de la transcripción (Ranuncolo, 2012).

De esta manera, dado que los aminoácidos modificados por O-GlcNAc son los mismos empleados por diversas proteínas Ser/Thr cinasas se ha sugerido una competencia entre ambos tipos de modificación, lo cual llevaría a generar diferentes tipos de respuesta celular dependiendo del balance entre las enzimas OGT u OGA (Hart, 2011).

1.2.1. Ruta de biosíntesis de hexosaminas

La vía biosintética de hexosamina (HBP) está caracterizada por seis pasos enzimáticos de los cuales dos, son compartidos con la glicolisis. El proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: La hexocinasa (HK) se encarga de fosforilar la glucosa para producir glucosa-6-fosfato, el cual será convertido después a fructosa-6-fosfato por la fosfoglucosa isomerasa (GPI). Después, la fructosa-6-fosfato y la glutamina son convertidas en glucosamina-6-fosfato (GlcN-6P) y glutamato por la primera enzima fructosa-6-fosfato transminasa (GFAT), proteína que regula la velocidad de la ruta metabólica. La siguiente enzima, glucosamina-fosfato N-acetiltransferasa (GNPNAT) convierte la GlcN-6P y la Acetil-coenzima A (Ac-CoA) en N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6P) y CoA. En seguida, la GlcNAc-6P es isomerizada en GlcNAc-1P por la GlcNAc fosfomutasa (PGM3/AGM1) y, finalmente, el UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (UAP1) convierte UTP y GlcNAc-1P a UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) y pirofosforilasa (PPi) (Figura 8).

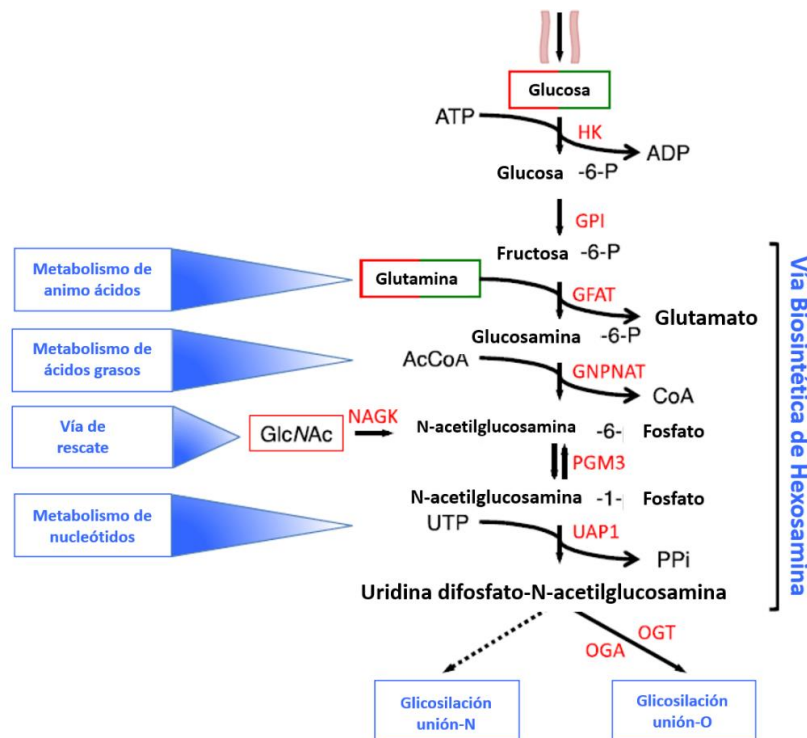


Figura 8. Representación esquemática de la vía biosintética de hexosamina. Enzimas de HBP son representadas en rojo, metabolitos en negro, procesos celulares en azul claro. Las cajas verdes/rojas indican los metabolitos cuyo cambio induce la disminución (verde) o incremento (rojo) de UDP-GlcNAc. Tomado de Chiaradonna, 2018.

La UDP-GlcNAc será el sustrato para O- y N-glicosilaciones, siendo un componente de uniones simples o complejas de O- y N-glicanos cuya adhesión a las proteínas dirige la formación de complejas glicoproteínas y proteoglicanos llamados glicoconjugados (Chiaradonna, 2018).

Varios autores han confirmado que el cambio en la concentración de nutrientes intracelulares modula la cantidad de UDP-GlcNAc intracelular y el flujo de HBP. En un estudio previo se observó que la disponibilidad de la glucosa en adipocitos aislados, pretratados con insulina para potenciar el transporte de glucosa, indujo un rápido incremento de UDP-GlcNAc (Marshall, 2004). Es por eso que, se asume que la O-GlcNAcilación constituye un mecanismo biológico donde se relaciona el metabolismo sobre la respuesta de las células ante los diferentes estímulos.

1.2.2. Efecto de OGT como sensor de metabolismo

Como se describió antes, son varios cientos de proteínas (cerca de 500) las que pueden sufrir esta modificación (Gabiús, 2009) por ello es importante la presencia tanto de la enzima O-GlcNAc Transferasa u OGT como del precursor UDP-GlcNAc para favorecer la modificación de los residuos de Ser/Thr de las proteínas citoplasmáticas y nucleares.

En la Tabla III se presenta un cuadro de los principales efectos donde puede impactar la O-GlcNAcilación. Como se puede observar sus efectos van desde el tráfico de glicoproteínas (β -catenina y E-cadherina) y la respuesta inmunológica, pasando por mecanismos de comunicación intracelular, regulación de transcripción y la regulación del ciclo celular y/o estrés celular, hasta estar asociada a ciertos procesos patológicos neurodegenerativos.

Es importante destacar que varios estudios han evidenciado que la O-GlcNAcilación parece relacionarse con el desarrollo de procesos patológicos vinculados con el metabolismo de carbohidratos, tal como sucede con la Diabetes mellitus. Como se describió arriba la ruta biosintética de las hexosaminas (Figura 8) sirve como un sistema sensor del metabolismo

Tabla III. Reconocimiento del fenómeno asociado con la glicosilación de O-GlcNAc. En la siguiente tabla se muestran las diferentes funciones que competen a la O-GlcNAcilación en el organismo. Tomado de Varki, 1999.

FENÓMENO DE RECONOCIMIENTO	EJEMPLOS
Tráfico de glicoproteína	Trafico de β -Caterina y E-caderina en células epiteliales son dependientes de la O-GlcNAcilación
Reconocimiento inmunológico	Sustitución de péptidos por O-GlcNAc juegan un rol en la unión del complejo de MHC y en el reconocimiento del complejo de MHC –unido a epítopes por TCR.
Vías de señalización	<ul style="list-style-type: none"> - O-GlcNAc – O-fosfato regulan la señalización de moléculas. - O-GlcNAc – O-fosfato juegan un rol en el ciclo celular. - Un inhibidor de O-GlcNAcasa previene la transición de G/M en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>. - Modulación de la proteína del golpe de calor de la vía de señalización es dependiente de glucosa para su protección.
Regulación de proteólisis	<p>β-O-GlcNAc juega un rol en la administración de recambio proteico.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Los sitios de unión de β-O-GlcNAc tienen una alta puntuación de PEST, el cual es emparejado con la regulación además de la degradación proteolítica. - Degradación proteolítica de proteínas es disminuida después de la O-GlcNAcilación.
Regulación de transcripción	<p>RNA polimerasa II y muchos factores de transcripción son O-GlcNAcilados.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Las unidades de β-O-GlcNAc sobre las proteínas tienen una acción directa sobre su actividad y son integrados en general dentro de la regulación transcripcional.
Supervivencia al estrés y ciclo celular	<p>Estrés celular es asociada con un transitorio, incremento general en la O-GlcNAcilación.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Este proceso podría involucrar el golpe de calor en proteína O-GlcNAciladas además de la estabilización de la estructura de las proteínas, la limitación de formación de agregándose proteínas o la acción directa sobre el golpe de calor en la actividad proteica y localización.
Enfermedad	<p>Diabetes</p> <ul style="list-style-type: none"> - O-GlcNAc juega una parte en la señalización de la insulina y regulación de la toxicidad de la glucosa. - La señalización de la insulina puede ser bloqueada en adipocitos o músculo con el incremento en la O-GlcNAcilación. - Altos niveles de UDP-GlcNAc promueve la O-GlcNAcilación y la toxicidad de la glucosa es unida con la vía de hexosaminas y la regulación de los niveles de UDP-GlcNAc. <p>Enfermedades neurodegenerativas</p> <p>Loci cromosomal esta asociado con las enfermedades neurodegenerativas incluidos los genes para OGT y O-GlcNAcasa.</p> <ul style="list-style-type: none"> - La formación enredos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer asociada con una anormal fosforilación de la proteína TAU. La proteína es O-GlcNAcilada y esta forma previene la formación de enredos. - Tejido cerebral de pacientes con Alzheimer mostraron una reducción global in la O-GlcNAcilación. - Tejido cerebral con Alzheimer mostro una formación neuronal de placas amiloides que contienen la proteína amiloide-β O-GlcNAcilada de la proteína precursora. - Otras anomalidades de proteínas O-GlcNAciladas tienen que ser detectadas en la enfermedad de Alzheimer relacionada a neurofilamentos con hipo-O-GlcNAcilación o la reducción de la O-GlcNAcilación del ensamble de proteínas clatrina unidas a una vesícula reciclada sináptica.

celular general, donde no sólo el metabolismo de carbohidratos participa sino también el de los aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos. De esta manera, las alteraciones relativas entre los intermediarios de esta ruta biosintética nos indicarán cambios en los diferentes aspectos del metabolismo general.

Asimismo, la ruta biosintética de las hexosaminas permite funcionar como un sistema de retroalimentación negativa, permitiendo manejar el extenso consumo de glucosa en respuesta a las condiciones de hiperglicemia e hiperinsulinemia (Chiaradonna, 2018). De esa manera, en un escenario donde hay niveles anormalmente elevados de glucosa, algunos estudios han confirmado que la asociación entre los niveles de glucosamina, la resistencia a la insulina y la O-GlcNAcilación de los factores de transcripción, ha llevado a la hipótesis que una anormal glicosilación de los factores de transcripción quizás debido a los niveles elevados de UDP-GlcNAc podría ser un mejor mecanismo detrás de los efectos pleiotrópicos de la toxicidad de la glucosa y resistencia a la insulina. Primeramente, como consecuencia

del exceso de carbohidratos, los niveles de glucosamina se incrementarían y, llevaría a un aumento de los niveles de UDP-GlcNAc, favoreciendo los eventos de O-GlcNAcilación de proteínas. Por otro lado, se reconoce en los adipocitos que la presencia crónica de niveles elevados de insulina, glucosa y glucosamina puede favorecer la resistencia a la insulina. En ese sentido, se puede considerar a la O-GlcNAcilación como un sistema de retroalimentación negativa, controlando la función de varias de las proteínas clave de la regulación metabólica. La falta de control en el manejo del exceso de carbohidratos puede propiciar no sólo un incremento de la O-GlcNAcilación, sino el desarrollo de resistencia a insulina y, eventualmente, la diabetes mellitus (Varki, 1999). A este respecto, al haber un incremento en el flujo de la vía HBP, se generará un incremento de azúcares tales como β -D-N-acetilglucosamina acoplados a las proteínas citoplasmáticas. Este incremento total de la O-GlcNAcilación es una característica frecuentemente observada en las células cancerígenas y estudios recientes sugieren que la O-GlcNAcilación es un comunicador central del estatus nutricional para el control clave de señalización y vías metabólicas que regulan múltiples fenotipos de células cancerígenas (Ferrer, 2016).

1.2.3. Efectos fisiológicos de la O-GlcNAcilación

En la actualidad se sugiere que la O-GlcNAcilación desempeña un papel clave en la regulación y señalización intra e intercelular. Por lo que también se ha propuesto que alteraciones en este mecanismo de regulación permitiría desencadenar el desarrollo de ciertas enfermedades, tal es el caso de Diabetes mellitus tipo II, cáncer y padecimientos neurodegenerativos (Tabla III) (Vaidyanathan, Durning and Wells, 2014; Banerjee, Lagerlof and Hart, 2016). Hay que hacer notar, sin embargo, que relativamente pocos estudios se habían realizado hasta hace unos 10 años, por lo que el estudio de sus efectos en procesos fisiopatológicos es muy reciente.

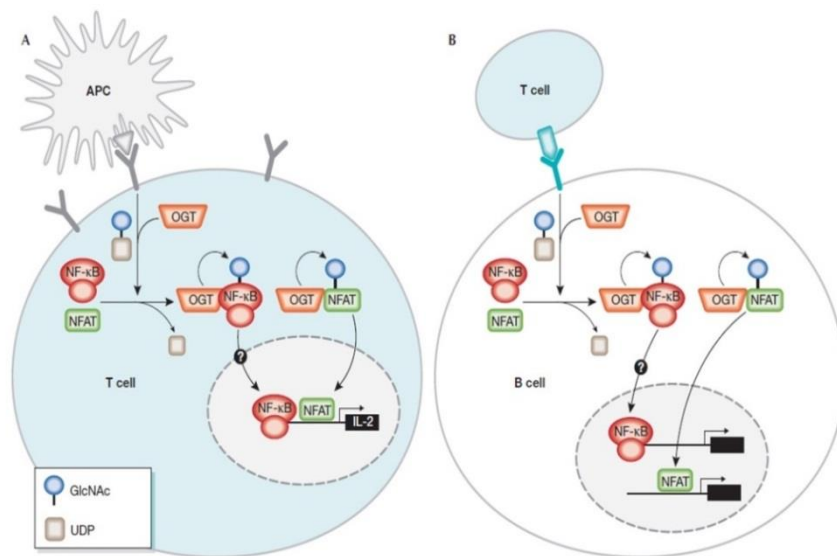


Figura 9. Efecto hipotético de O-GlcNacilación en activación de linfocitos T y B. (A) La modificación por grupos GlcNAc durante la activación de células T activan factores de transcripción (NFAT yNF-kB) necesarios para la transcripción de muchos genes, tal como IL-2. (B) Mientras que en las células B, la modificación por GlcNAc son cruciales para la reprogramación de células B. Tomado de: Golks, 2008.

Por otro lado, también se ha reportado que O-GlcNAc podría jugar un papel activo en la modulación del sistema inmunológico. Hart y cols., propusieron que durante la activación de linfocitos T con diversos estímulos tal como PMA/ionomicina y Concanavalina A, llevaron a un rápido incremento de glicoproteínas citosólicas y nucleares modificadas por O-GlcNAc (Hart, 2011). En este sentido, también se ha sugerido que diversos factores de transcripción dependientes de la activación de linfocitos T a través del TCR, podrían ser modificados por O-GlcNAc. De esa manera, se ha reportado que el factor de transcripción NFkB sufre transitoriamente cambios por modificación de O-GlcNAc (Xing, 2011). Así también, se ha descrito que el factor de transcripción de NFAT y los factores de respuesta a interferones contiene sitios que podrían ser modificados por O-GlcNAc, por lo que se ha sugerido que su modificación con glicosilación podría modular la transcripción de muchos genes, como se describe gráficamente en la Figura 9.

2. ANTECEDENTES

2.1. O-GlcNAcilación en patologías e infecciones virales

A pesar de ser un evento celular descubierto hace casi 40 años, el impacto de la O-GlcNAcilación durante las infecciones virales es relativamente poco estudiado. Mediante una búsqueda intencionada en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) de los términos "O-GlcNAc" y "virus" en el abstract nos arrojó un resultado de 28 publicaciones entre 1995 y 2022. Por su parte, al realizar la búsqueda con los términos "influenza" y "O-GlcNAc" nos arrojó 2 resultados en marzo 2022. Todo esto sugiere que nos encontramos en una primera etapa de la comprensión del papel de la O-GlcNAc en las infecciones virales.

Sin embargo, algunos estudios previos han observado una relación entre la modificación por O-GlcNAc de proteínas citosólicas y la replicación de los virus VIH, VHS, HVSK, PVH y VHTL-1, aunque los resultados han sido diferentes para cada caso (Jochmann, 2009; Angelova, 2015).

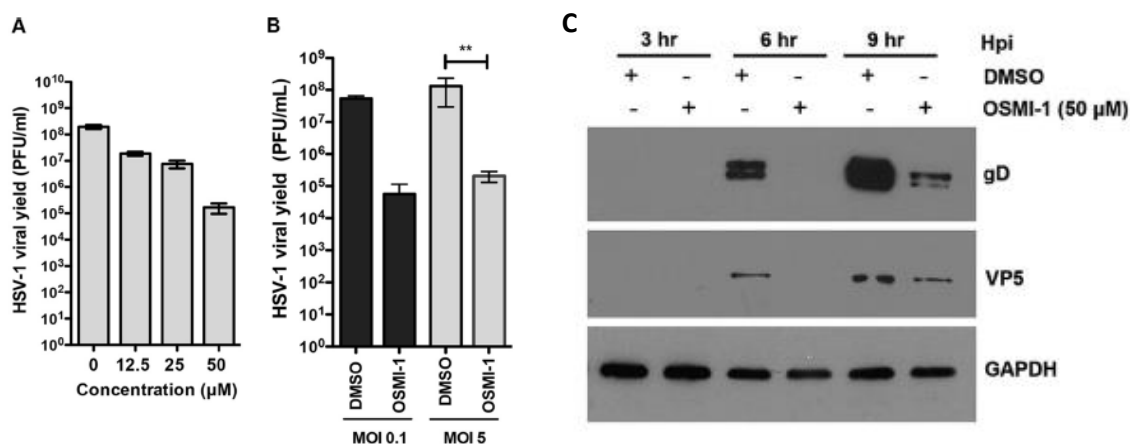


Figura 10. La inhibición de la enzima OGT induce un efecto antiviral para la infección por el Herpes Virus humano. A y B. EL inhibidor OSMI-1 disminuye el título viral tras la incubación con cultivo de células HFF. C. Tratamiento con 50 μM de OSMI-1 el cual inhibe la expresión de proteínas virales gD y VP5. Tomado de: Angelova, 2015.

En el caso de VIH (virus de inmunodeficiencia humana)-1, Stürzl y cols. modificaron la O-GlcNAcilación celular durante la infección por el virus, al incubar las

células en presencia de glucosamina, o, directamente, al ocasionar su sobreexpresión. De esta manera, observaron la inhibición de la actividad del promotor de VIH-LTR y, en consecuencia, el bloqueo de la infección viral. Asimismo, en ensayos *in vitro*, se propuso que este efecto era dependiente de la glicosilación del factor transcripcional Sp1, que se requiere para la completa funcionalidad de la maquinaria de replicación del virus (Jochmann, 2009). De manera similar, la infección por Herpes Virus Simple (SHV) y CitomegaloVirus (CMV) son influidas por la acción de la enzima OGT, ya que al inhibir esta, desfavorece la replicación del virus del Herpes (Figura 10). En un estudio del grupo de Knipe y cols. observaron que, particularmente, se requiere la O-GlcNAcilación del factor de transcripción HCF-1 para la transactivación de los genes tempranos del virus, por lo que su alteración por inhibidores bloquea el ciclo replicativo de ambos tipos de virus (Angelova, 2015).

Conviene resaltar que este tipo de resultados los obtuvieron inhibiendo la enzima OGT por dos técnicas: RNA de interferencia y el empleo del inhibidor selectivo OSMI-1, que fue la misma molécula que se empleó en un estudio *in vitro* en nuestro grupo de investigación y que constituye el antecedente directo más próximo a la presente tesis para la maestría.

En el mismo sentido, de los casos previamente descritos, para el caso del Herpes Virus Asociado al Sarcoma de Kaposi (HVSK), la acción de la enzima OGT y, por tanto, la O-GlcNAcilación modifica varias de las proteínas virales, entre las cuales se encuentra la proteína Activadora de la replicación y transcripción. En dos estudios independientes se observó que el incremento de la O-GlcNAcilación sobre estas proteínas lleva al bloqueo de la replicación y, por tanto, inhibe de manera directamente proporcional la infección viral (Ko, 2012; Jochmann, 2013).

Por el contrario, un estudio reciente muestra que la acción de la enzima OGT parece ser requerido para la expresión y síntesis de las oncoproteínas E6, E7 y HCF-1 del Papiloma Virus humano (sHPV), por lo que la inhibición de la O-GlcNAcilación por la técnica de RNA de interferencia lleva a la inhibición de la propagación tumoral de un modelo experimental en ratón. Interesantemente, este efecto parece depender de la proteína CXCR4, lo cual parece impedir que las células tumorales se desprendan del tumor para generar la metástasis (Kim, 2017).

Por otro lado, la infección por el Virus Linfotrófico de células T humanas-1 (HTLV-1) parece estar regulada por el nivel de O-GlcNAcilación, donde la acción contrapuesta de

las enzimas OGT y OGA modifica el factor de transcripción CREB, el cual a su vez es una subunidad funcional del complejo de transactivación dependiente de la proteína Tax. De esta manera, la inhibición farmacológica de la enzima OGA incrementa la O-GlcNAcilación de CREB, la formación del complejo de transactivación y el ciclo replicativo del virus HTLV-1 en células *in vitro* (Groussaud, 2017).

2.1.1. O-GlcNAcilación en la infección por el virus Influenza

En un estudio reciente se muestran evidencias experimentales de que la generación de la "tormenta de citocinas", ocasionada por el virus Influenza, pudiera desencadenarse por un mecanismo dependiente de O-GlcNAcilación (Wang, 2019). En este estudio se confirmó, en condiciones *in vitro* y en un modelo murino, que la infección por el virus Influenza H1N1 (A/WSN/33) se altera al activar la ruta de biosíntesis de hexosaminas o la actividad de las enzimas OGT u OGA, como se muestra en la Figura 11. En paralelo, los autores confirmaron que la O-GlcNAcilación estaba vinculada con un incremento en la expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias. Posteriormente, por experimentos de inmunoprecipitación y construcción de recombinantes observaron que la O-GlcNAcilación del factor de regulación a interferones tipo 5 (IRF5), parece ser la molécula clave en el curso de la infección viral. De esa manera, los autores confirmaron que la enzima OGT interacciona y glicosila a IRF5 en la Ser 430, proceso que favorece su poliubiquitinación y degradación por un mecanismo dependiente del proteasoma celular. De esa manera, por un lado, se ofrece una explicación de cómo la infección viral induce la inhibición de la respuesta a interferones, y, por el otro lado, se propone un nuevo mecanismo para proponer la generación de la "tormenta de citocinas", como se explica en la Figura 12.

Sin embargo, como era de esperarse, el papel de la O-GlcNAcilación durante la infección por el VIA no es tan sencillo. Otro estudio reciente propone evidencias que sugieren que este tipo de modificación va a jugar un papel importante para que las proteínas MAVs, presentes en la mitocondria, detecten los ARNs de hebra sencilla y, por lo tanto, inicien una respuesta antiviral dependiente de interferones (Song, 2019).

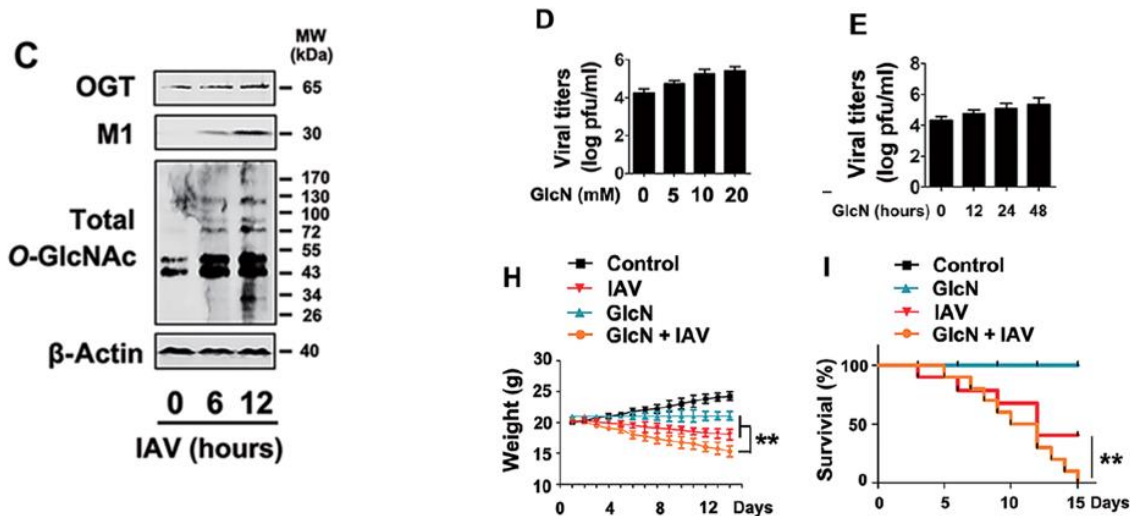


Figura 11. Importancia de O-GlcNAcilación durante la infección por el virus Influenza. C. Se realizó un WB donde se midieron varias proteínas como OGT, M1, O-GlcNAc y B-Actina. Y lograron observar que conforme transcurre el tiempo con la infección por VIA hay una mayor expresión de estas proteínas, sugiriendo que la infección por VIA potencia estas proteínas conforme el paso del tiempo. D. Se midió el título viral de acuerdo con las diferentes cantidades de GlcN (glucosamina) que se aplicaron en los ensayos de infección, lo que determinó que a mayor cantidad de GlcN mayor título viral se presenta. E. Nuevamente se midió el título viral, con una dosis establecida de 10 mM de GlcN, que se midió a diferente escala de tiempo (0, 12, 24 y 48 hrs) y se observó que conforme más transcurría el tiempo más título viral se presentaba. H. Este experimento se realizó en ratones, donde sometieron a estos a diferentes condiciones (Control, IAV, GlcN y GlcN + IAV) y midieron el peso de estos, lo que lograron observar fue que los ratones que fueron sometidos al tratamiento de GlcN + IAV tuvieron una mayor pérdida de peso en comparación con los de IAV solo. I. Aquí lo que se analizó fue la supervivencia de los ratones, donde fueron sometidos a las mismas condiciones previamente mencionadas, y se logró observar una mayor mortalidad en aquellos animales que fueron sometidos al tratamiento de GlcN+IAV en comparación que IAV, lo que nos sugiere que la GlcN potencia la infección por el virus de Influenza. Tomado de Wang, 2019.

Dado que este estudio se centró en las células inflamatorias presentes en el tejido pulmonar, por lo que, a diferencia del estudio de Wang y colaboradores en 2019, donde se observó que la adición de GlcN favorece la infección y, por lo tanto, la respuesta pro-inflamatoria (Figura 11). El estudio de Song y colaboradores parece mostrar lo contrario: la adición de la GlcN inhibe la infección viral debido al hecho de que O-GlcNAcilación respuesta importante para la generación de la respuesta antiviral por interferones (Figura 12).

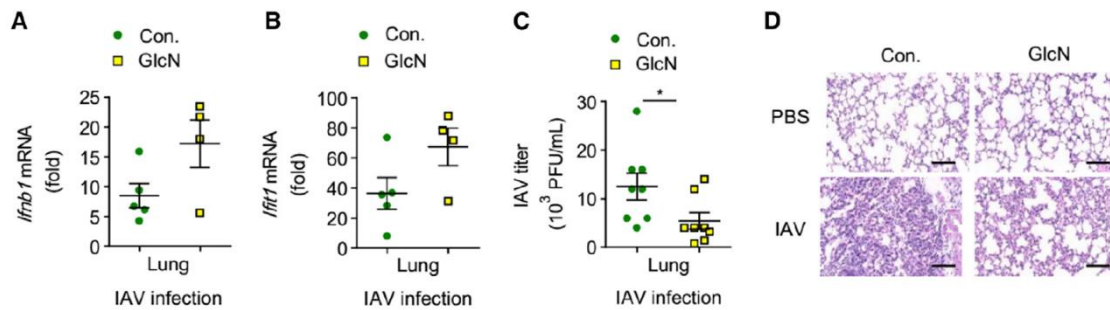


Figura 12. La GlcN ayuda a los ratones contra la infección por VIA mediante interferones. En este estudio se infectaron ratones con VIA, y un grupo fue suplementado con GlcN, los que se observó que La GlcN protegió a los ratones contra infección por VIA, mediante la expresión de Interferones como se pudo mostrar en los paneles A y B, al mismo tiempo se observó una disminución del título viral en los pulmones de los ratones infectados como se observa en el panel C, agregando una histopatología del pulmón de los ratones en ambas condiciones, se observó que hubo menor daño en aquellos que fueron tratados con GlcN a comparación de aquellos que no, como se observa en el panel D. Tomado de Song, 2019.

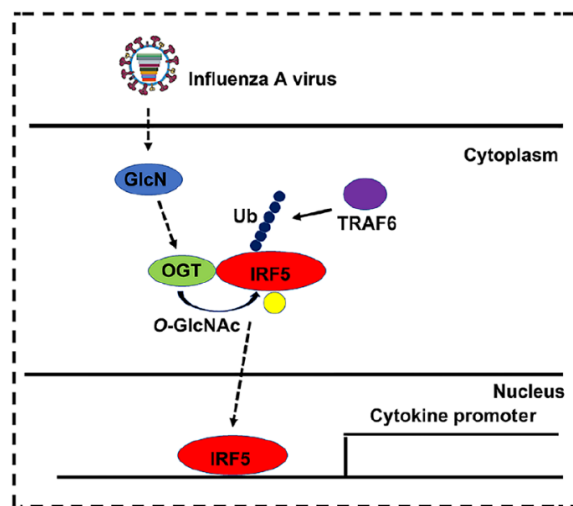


Figura 13. Papel hipotético de la O-GlcNAcilación en base a estudio de Wang y cols. El estudio de Wang concluyó en que, cuando el virus de Influenza infecta a la célula, esta potencia la O-GlcNAcilación, la cual por medio de la enzima OGT, O-GlcNAcilara a la proteína IRF5, la cual al ser O-GlcNAcilada será poliubiquitinada y degradada por TRAF6 lo cual llevara a no desencadenar la expresión de Interferones y como consecuencia se desarrollaran citocinas proinflamatorias. Sin embargo, si IRF5 no es O-GlcNAcilado, este viajara al núcleo de la célula y llevara a cabo la expresión de Interferones los cuales combatirán al Virus de Influenza. Tomado de Wang, 2019.

Sin embargo, el estudio de Wang y colaboradores, sugirió que la infección por VIA incrementa la O-GlcNAcilación mediante la vía de hexosaminas donde OGT se encargara de O-GlcNAcilara a IRF5 y por ende será poliubiquitinado para llevarlo a su degradación

mediante TRAF6 impidiendo que haya una expresión de proteínas que actuaran contra el virus de Influenza, caso contrario, si IRF5 no es O-GlcNAcAcilado este podrá viajar al núcleo celular e inducir la expresión de citocinas que ayudaran contra la infección del virus de Influenza (Figura 13).

Por otro lado, como parte de la tesis de licenciatura, que llevé a cabo en el laboratorio de Citocinas y Autoinmunidad de la Facultad de Farmacia y, empleando sólo el modelo de células A549, se observó que la O-GlcNAcAcilación se incrementa en células infectadas por el virus H1N1 (A/New Caledonia/99) a 48 hpi (western blot con el anticuerpo RL-2) en comparación con las condiciones control o menor tiempo de infección (Figura 14).

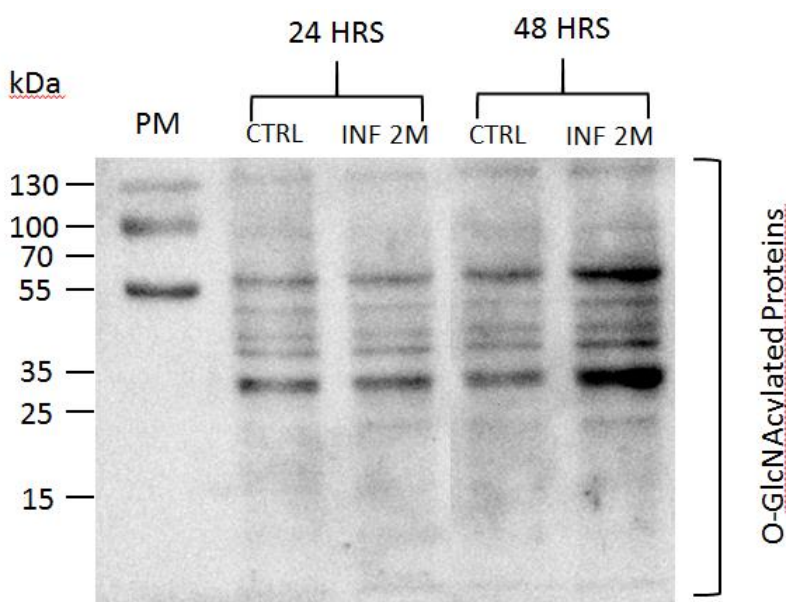


Figura 14. Efecto de la O-GlcNAcAcilación durante la infección por virus Influenza H1N1 *in vitro*. Como se puede observar en la imagen, en un experimento realizado con las condiciones de control, infectado en 24 horas y control e infectado a 48 horas. Se realizó un Western Blot, donde utilizando el anticuerpo contra O-GlcNAc logramos ver una intensidad mayor en el carril del infectado a 48 horas, esto haciendo referencia, que la infección incrementa la glicosilación a las 48 horas. Sugiriendo que la glicosilación es parte importante de la infección viral y esta es necesaria para ello. Tomado de Núñez-Rueda, 2018.

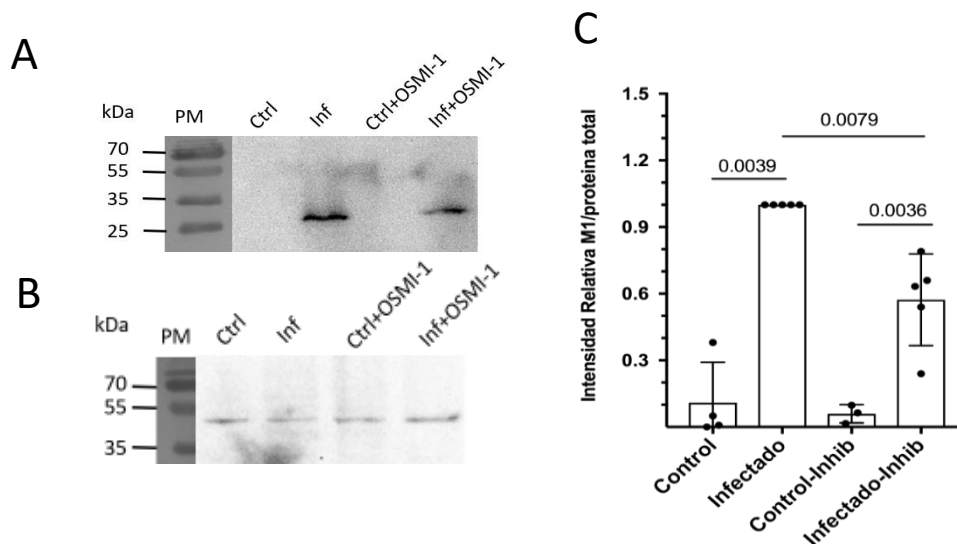


Figura 15. El perfil de O-GlcNAcilación se incrementa en células infectadas por Virus Influenza A H1N1. A. En un ensayo de Western blot, se incubaron con anticuerpo para proteína viral de Influenza M1. Donde tenemos a nuestro control, células infectadas con H1N1, células control más el inhibidor OSMI-1 y células infectadas con inhibidor OSMI-1. Como se observa en las bandas de los carriles infectados, hay una disminución en la intensidad de la banda donde se utilizó el inhibidor OSMI-1, sugiriendo que disminuye la replicación del VIA. B. Experimento en el cual se comparan los niveles de β -Actina, en las células con los diferentes tratamientos, sugiriendo que hay una carga equitativa de la proteína. C. Efecto relativo de OGT sobre los niveles de M1 viral en relación con los niveles de proteína teñida por coomassie R-250. Tomado de Núñez-Rueda, 2018.

Al mismo tiempo, también se observó que el empleo del inhibidor de la enzima OGT (OSMI-1) ocasionó la disminución significativa de los niveles de la proteína viral M1, en comparación con los niveles basales de α -actina (Figura 15). En su conjunto, todo lo anterior sugeriría que la O-GlcNAcilación es un evento que podría regular el ciclo replicativo del virus.

2.2. Efecto de TGF- β en infección por virus Influenza

Estudios recientes por nuestro grupo de investigación, empleando como modelo las células A549, mostraron que la activación de la ruta de señalización del TGF- β previo a la infección inhibe el programa de inducción de apoptosis y replicación del virus Influenza H1N1.

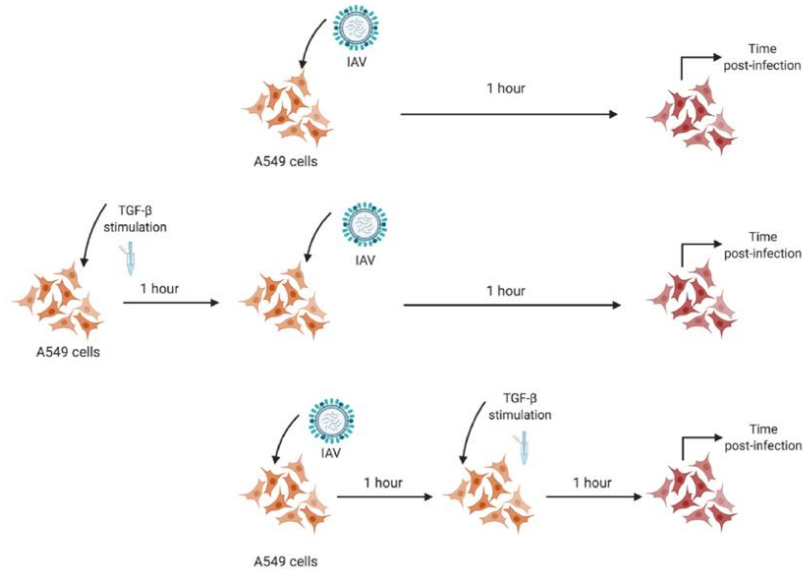


Figura 16. Modelo experimental de infección por Influenza A H1N1 con tratamiento de TGF- β . Se pueden observar las diferentes condiciones que se establecieron para la realización de la infección por VIA. Donde en la parte superior se infectaron células A549 con virus de Influenza A H1N1 cepa New caledonia 99; hacia la parte central se estimularon las células con TGF- β previamente una hora a la infección por VIA, mientras que en la parte inferior se infectaron las células por VIA y posteriormente se estimularon con TGF- β . Tomado de BustosRivera-Bahena, 2021.

En la Figura 16 se muestra el diseño de los experimentos, donde se compararon 3 diferentes tratamientos: células sin infectar, células incubadas con TGF- β , células infectadas con VIA H1N1 y células incubadas primero con TGF- β y después infectadas con VIA. En estas circunstancias, se observó que el pre-tratamiento con esta citocina inhibió la muerte celular, así como la expresión de al menos 16 proteínas pro-apoptóticas inducidas, al tiempo que se inhibió la activación de la caspasa 1 y la secreción de IL-1 β .

Como se observa en la Figura 17, el pretratamiento con TGF- β ocasionó la inhibición parcial de la expresión de la proteína viral M1 y el título viral. Mientras que el incremento de los niveles de Smad7 coincidió con la infección viral, la fosforilación de las proteínas Smad 2 y 3 (vía canónica) coincidió con el pretratamiento con TGF- β . Todo esto sugiere que la activación por este factor de crecimiento interfiere de manera importante en la programación de los eventos intracelulares durante el curso de la infección por Influenza; sin embargo, hasta el momento no tenemos información que nos permita confirmar cuáles son mecanismos responsables. En ese sentido, nuestra idea original fue proponer un estudio para evaluar si el pre-tratamiento con TGF- β podría modificar el perfil de O-GlcNAcilación y, consecuentemente, provocar un cambio en ciclo replicativo del VIA.

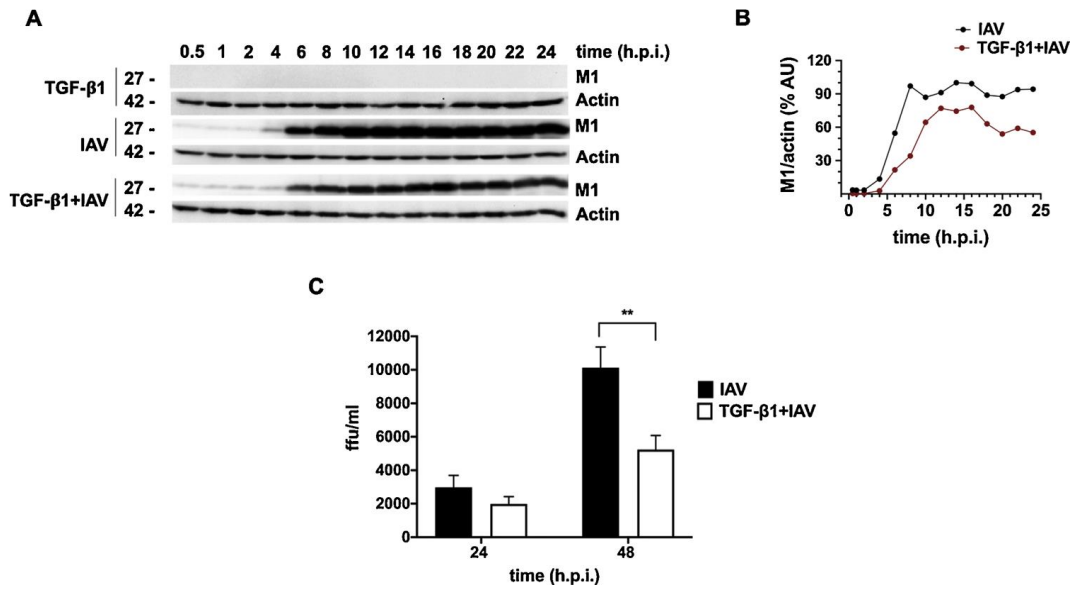


Figura 17. Pretratamiento con TGF-β1 inhibe la expresión de M1 y la replicación viral en células A549. A) La expresión de M1 en lisados de células infectadas por VIA con pretratamiento con TGF-β1 24 post-infección. B) Comparación entre la proteína total de M1 contra β-actina de dos ensayos independientes en células A549. C) Efecto de TGF-β1 sobre el título viral. Tomado de (BustosRivera-Bahena, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La Influenza constituye una enfermedad de alta prevalencia en humanos a nivel mundial y, particularmente con el tipo A donde hay interacciones entre humanos y otras especies, se puede propiciar la generación de cepas más infectivas o con efectos clínicos más severos en humanos (epidemias y pandemias). Todo eso justifica los esfuerzos para poder entender el ciclo replicativo del virus, con el objetivo de identificar nuevas rutas que posibiliten inhibir la infección viral o sus efectos severos sobre la respuesta inflamatoria del paciente infectado.

Por otro lado, estudios relativamente recientes han descrito que la O-GlcNAcilación está involucrada en un sinnúmero de mecanismos de regulación celular, siendo particularmente atractivo como un sistema de regulación entre el metabolismo energético y los mecanismos celulares y fisiológicos. Paradójicamente, a pesar de ser un mecanismo descrito desde hace varias décadas, se conoce muy poco de su papel durante las infecciones y, particularmente, provocadas por los virus. A ese respecto, sólo identificamos dos estudios previos que han evaluado el potencial efecto de la O-GlcNAcilación durante el proceso infeccioso del virus Influenza humano (Wang, 2019; Song, 2019). Mientras que en el primer estudio sugiere que la infección viral estimula la tormenta de citocinas" por un mecanismo dependiente de la O-GlcNAcilación de IRF5 y donde la adición de GlcN favorece la infección y la respuesta inflamatoria. Mientras que, en el segundo estudio, se muestran evidencias de que la respuesta antiviral dependiente de las proteínas MAVS depende de eventos de O-GlcNAcilación y donde, por el contrario, la adición de GlcN en un modelo de infección murino, otorga resistencia del ratón a la infección viral. Interesantemente, como se mencionó antes, los resultados previos de nuestro grupo coincidieron con las conclusiones de los autores primera publicación, razón por la cual quisimos evaluar el posible efecto de TGF- β en este modelo celular.

En el actual estudio, se propone evaluar el efecto de la O-GlcNAcilación en un contexto experimental particular descrito recientemente por nuestro grupo de investigación, donde la pre-activación de la ruta de señalización de TGF- β altera el programa infeccioso del virus Influenza. Sin embargo, desconocemos si esta inhibición del TGF- β sobre la infección viral es mediada por eventos de O-GlcNAcilación.

4. HIPÓTESIS

Tanto la O-GlcNAcilación como el tratamiento con TGF- β inducirá un cambio en la infección *in vitro* de células A549 por el virus Influenza.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar la posible relación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β sobre la infección *in vitro* por el virus Influenza.

5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de glucosamina (GlcN) sobre infección viral *in vitro*.
2. Confirmar efecto inhibitorio del pre-tratamiento por TGF- β sobre infección viral *in vitro*
3. Evaluar el efecto de los inhibidores de OGT y de OGA sobre infección y efecto del TGF- β .
4. Evaluar el efecto de los inhibidores de OGT y de OGA sobre cambios de O-GlcNAcilación en células infectadas y tratadas con TGF- β o GlcN.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Virus

Se empleó el virus Influenza A/H1N1/New Caledonia/20/99, el cual fue originalmente donado por Carlos Arias (IBT, UNAM). Estudios previos mostraron que el lote de virus empleado de virus presentó un título de 5×10^6 pfu/ml (BustosRivera., et al. 2021). Para los últimos experimentos, debido a limitaciones de alícuotas de virus, se empleó líquido alanteoideo derivado de la infección por virus H1N1 (sin titular).

6.2. Modelo celular

Se utilizó la línea celular A549 (ATCC CCL-185), derivada de epitelio pulmonar humano, la cual fue adquirida en ATCC en el año 2014. Para su manejo, se siguieron las recomendaciones de esterilidad y biocontención descritas en manuales especializados (Freshney. 2005) y en acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas. Las células A549 tanto durante su mantenimiento como en los experimentos, se mantuvieron en el medio de cultivo DMEM Advanced F12 (Invitrogen) complementado con 1% de Glutamina, 3% de Suero Fetal de Bovino (SFB, Invitrogen) y 1% de antibiótico (Antibiótico-antimicótico, Invitrogen). Para su cultivo se mantuvieron en la incubadora (CO2 Water-Jacketed Incubator, Re TM US Outflow, NUAIRE) a 37°C con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO2 (INFRA).

6.3. Ensayos de infección *in vitro* por virus Influenza

Para llevar a cabo las infecciones, se utilizó una campana de flujo laminar instalada en el laboratorio 8 (BSL-1) de nivel de bioseguridad II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Para los ensayos de infección se colocaron un aproximado de 200,000 células por pozo en una caja de 6 pozos (Corning) y se dejaron proliferar durante aproximadamente 48 hrs hasta alcanzar confluencia >90%.

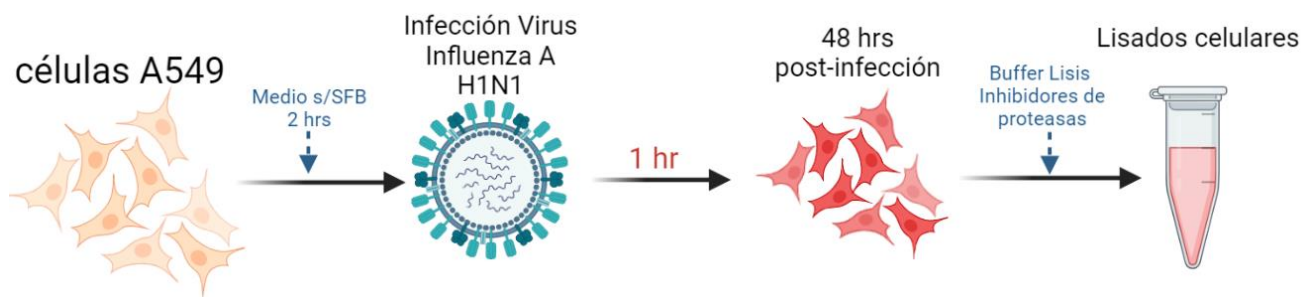


Figura 18. Esquema experimental de la infección por el virus de Influenza A H1N1. En esta figura podemos observar los elementos que se utilizan al igual que los pasos a seguir para el desarrollo de la infección por el virus de influenza en células A549.

Para los ensayos de infección, posterior a retirar el medio suplementado con SFB se realizaron los lavados de las células con PBS, estas se incubaron en medio de cultivo DMEM-F12 libre de suero fetal bovino (SFB) durante 2 hrs previo a la adición del virus, así como se observa en la figura 18.

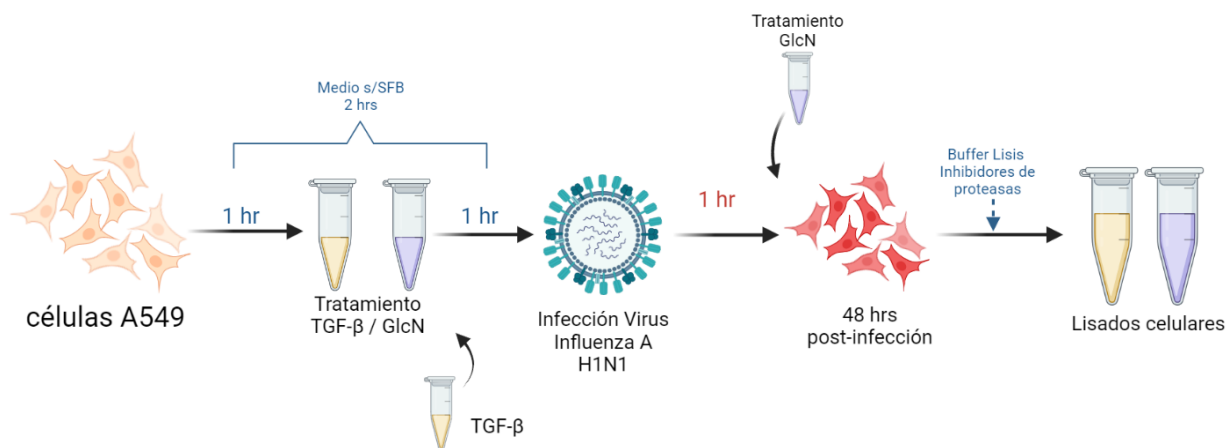


Figura 19. Esquema experimental de la infección por el virus de Influenza A H1N1 con tratamiento de TGF-β y GlcN. En la imagen representada se observa un esquema donde se observan las diferentes condiciones y pasos establecidos que se siguieron para desarrollar la infección por VIA con los tratamientos de TGF-β y GlcN.

Como siguiente paso, se desarrollaron los ensayos con pre-tratamiento con TGF- β o GlcN, el agente se adicionó 1 hora antes de agregar el virus al ensayo, Así como se observa en la figura 19. Pasadas las 2 hrs de incubación, las células fueron lavadas con PBS y, a continuación, se incubaron con medio de cultivo libre de SFB en presencia de 4 MOI de virus Influenza H1N1 durante 1 hora. Posterior a ese tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS, en seguida se agregó nuevamente medio libre de SFB y se le añadió 2 ng de TPCCK en las condiciones de infección y se dejaron incubar por 48 horas. Transcurrido este tiempo se, recuperaron el sobrenadante de cultivo y las células se lavaron con PBS para, finalmente, ser lisadas en buffer de Tris 100 mM, pH 7.5 con presencia de 0.1% de Triton X-100 y cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Para lo cual se rasparon los pozos con una espátula, se tomó el lisado y se agitó cada 6 veces cada 5 min en vortex, incubando el resto del tiempo el tubo de células en hielo. Al final de 30 min de lisis, la suspensión celular se centrifugó a 4°C a 10,000 rpm durante 10 minutos, seguido de eso se tomó el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf nuevos para almacenarse a 4°C, para su posterior análisis.

6.4. Tratamiento con GlcN sobre la infección de Influenza.

Para el desarrollo de los ensayos se colocaron 200,000 células por pozo en una caja de 6 pozos y se dejaron proliferar durante aproximadamente 48 horas a 37°C con 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia >90%. Como se describe en el apartado anterior, se procedió a retirar el medio de cultivo DMEM F12 con SFB, se realizaron 2 lavados con PBS estéril y se procedió a agregar nuevo medio de cultivo en ausencia SFB y en presencia de 10 mM de GlcN (Sigma), para dejar incubando por 2 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el medio cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS. Seguido de eso se agregó nuevo medio de cultivo sin SFB y en presencia de 4 MOI del virus de Influenza A H1N1 cepa New Caledonia 99 en los pozos marcados con esta condición y se incubó por 1 hr a 37°C con 5% de CO₂. Al terminar la hora en presencia del virus, se procedió a retirar el medio DMEM F12 y se realizaron nuevamente 2 lavados con PBS. Una vez realizado esto se procedió a colocar nuevo medio DMEM F12 a los pozos y se les agrego

2 ng/ml de TPCK (Sigma) en los pozos incubados con virus y se agregaron 10 mM de GlcN a las condiciones marcadas previamente con este tratamiento. Se procedió a incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 hrs. Transcurridas las 48 hrs, se colectaron los sobrenadantes y las células se lavaron con PBS, después fueron lisadas con buffer de lisis (previamente descrito), el cual contenía inhibidores de proteasas (Roche), justo como se muestra en la figura 19.

6.5. Tratamiento de TGF- β sobre la infección por virus de Influenza.

Para observar el efecto del tratamiento por TGF- β , previamente se cultivaron células para lograr obtener una confluencia > 90%. Posteriormente se procedió a realizar la infección, donde como primer paso se retiró el medio DMEM F12 con SFB y se realizaron 2 lavados con PBS, para después agregar nuevo medio DMEM F12 sin SFB y se dejaron incubando por 2 horas a 37°C con 5% de CO₂, como se muestra en la figura 19. Al transcurrir la primera hora se agregó 5 ng/ml de TGF- β 1 y se dejaron incubando por 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a retirar el medio y se realizaron 2 lavados con PBS. Después se agregó medio DMEM F12 sin SFB a los pozos y se agregaron 4 MOI de virus de Influenza A H1N1 y se incubaron durante 1 hora. Al terminar la hora de incubación con el virus, nuevamente se procedió a retirar el medio y se realizaron 2 lavados con PBS. Al terminar se agregó nuevo medio DMEM F12 sin SFB y se procedió a agregar 2 ng de TPCK en las condiciones de infección y se dejó incubando durante 48 hrs a 37°C con 5% de CO₂. Finalmente, transcurridas las 48 hrs se recuperaron los sobrenadantes y se lisaron las células con buffer de lisis conteniendo inhibidor de proteasas.

6.6. Inhibidores de OGT y OGA

Para la inhibición selectiva de la OGT se empleó el inhibidor OSMI-1 a una concentración final de 50 μ M, la cual se agregó antes y después de la infección [69]. Por su parte, para la inhibición selectiva de OGA se empleó el inhibidor PUGNAc a una

concentración final de 50 μ M colocándose antes y después de la infección. (Vosseller., et al. 2002), como se puede observar en la figura 20.

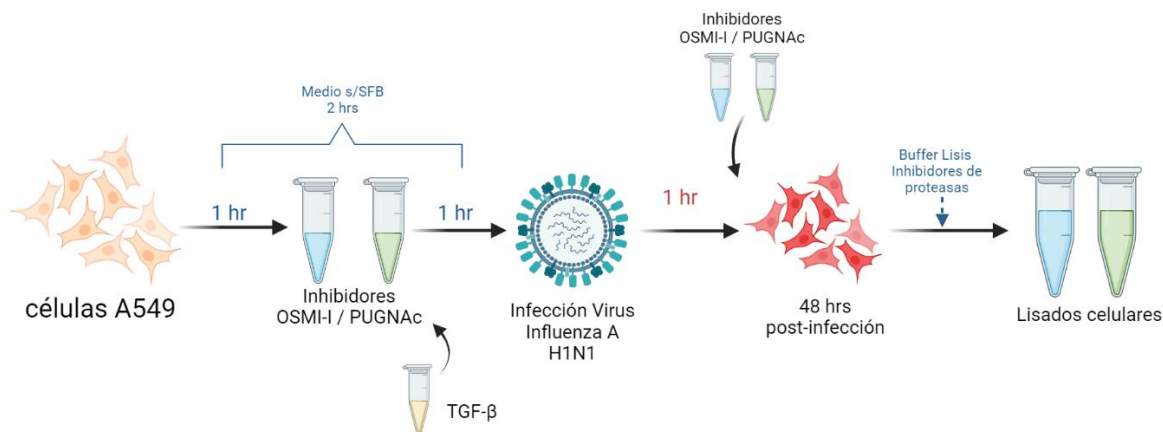


Figura 20. Esquema experimental de la infección por el virus de Influenza A H1N1 con los inhibidores OSMI-I y PUGNAc. En esta imagen podemos observar los elementos y pasos a seguir para la obtención de los lisados celulares con inhibidores de la OGT (OSMI-I) y OGA (PUGNAc) con o sin tratamiento con TGF- β .

6.7. Cuantificación de proteína de lisados celulares

La determinación de la concentración de proteína de los lisados celulares se realizó mediante la técnica de Bradford, empleando la modalidad de micro técnica. Para esto, en 20 μ l de solución se preparó una curva estándar con cantidades crecientes de Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma) entre 1 y 16 μ g. Asimismo, en pozos diferentes, se añadieron 2 μ l de los lisados celulares a evaluar, ajustando a un volumen final de 20 μ l. A continuación, se adicionaron 200 μ l de la solución de Bradford (Merk KGaA) sin diluir a todos los pozos y después de 5 min de incubación, se determinó la absorbancia en un lector de placas EPOCH (BioTek) a 595 nm. Con el fin de garantizar los resultados se llevaron a cabo duplicados de las muestras. Se considero como ensayos válidos aquellos con coeficiente de correlación superior a 0.90. Se determinaron las constantes de la ecuación de la línea recta para la determinación de la concentración de proteína en los lisados.

6.8. Evaluación de niveles de proteína viral M1

Para la determinación de los niveles de infección se tomó como referencia la presencia de la proteína M1 viral mediante un ensayo estandarizado de ELISA. Este ensayo consistió en la colocación de los lisados celulares del ensayo de infección realizado previamente en una caja de 95 pozos para ELISA. Se colocó una cantidad de 10 μ g de proteína por cada lisado en los pozos correspondientes, seguido de ello se colocó un blanco (Solución de carbonatos) y se les agregó solución de carbonatos a los lisados celulares; se selló la caja con plástico y se dejó en el refrigerador a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se sacó la caja del refrigerador y se procedió a retirar el sobrenadante de los pozos. A continuación, se realizaron 2 lavados con 100 μ l de solución de lavado (PBS con Tween-20 al 0.05%) durante 5 minutos y con agitación rotatoria. Al finalizar esto, se la solución de lavado se sustituyó con una solución de bloqueo (Leche descremada al 5% en solución de lavado). Los pozos se dejaron bloqueando por 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

Una vez transcurridas las 2 horas del bloqueo, se retiró la leche, se realizaron 2 lavados con solución de lavado y se adicionó la solución del anticuerpo específico para la proteína M1 (sobrenadante de cultivo del hibridoma XXX (ATCC) en dilución 1:20 v/v en solución de bloqueo) durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.

Al pasar las 2 horas de incubación con el primer anticuerpo, se procedió a retirar la solución, se realizaron 2 lavados con solución de lavado y se adicionó la solución del anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG de ratón acoplada con proteína HRP (marca) en dilución 1:1000 v/v en solución de bloqueo), para dejar incubar en agitación durante una hora a temperatura ambiente.

Transcurrida la hora de incubación del anticuerpo secundario, se procedió a retirar la solución, hacer 2 lavados con solución de lavado y adicionar 100 μ l de solución de ABTS (Milipore) a los pozos. La placa se dejó en agitación y en oscuridad durante 40 min para permitir el desarrollo de color. Finalmente, se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro EPOCH a 405 nm con corrección de 650 nm de longitud de onda. Con el fin de garantizar la reproducibilidad, cada ensayo se realizó en evaluación de ELISA por

triplicado. La estandarización de la técnica de ELISA para la cuantificación de la proteína viral M1 viene presentada en la primera sección de resultados.

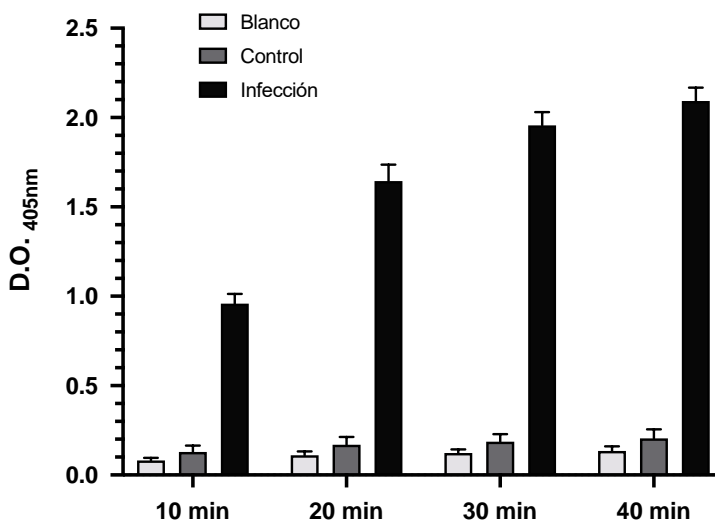


Figura 21. Estandarización de la expresión de la proteína M1 por ELISA. Se realizó una gráfica donde se pueden observar los datos de 2 experimentos donde se analizaron por espectrofotómetro cada 10 minutos para hacer un total de 40 minutos. Lo que se logró observar es que a los 30 minutos se tiene una lectura bastante estable en comparación con las otras, es por ello por lo que establecimos los 30 minutos como un dato más certero para nuestras próximas lecturas de experimentos. Al mismo tiempo, en comparación con el control, esto nos sugiere que, si existe una infección por VIA, al mostrar una mayor expresión en la D.O. para la proteína viral M1.

Para esta técnica se tuvieron que estandarizar varios aspectos de la técnica: 1) cantidad de proteínas de los lisados celulares por pozo; 2) dilución de la solución del anticuerpo anti-M1; 3) dilución de anticuerpo anti-IgG de ratón; 4) tiempo de incubación de placa de ELISA con reactivo ABTS. En la Figura 21 se observa una imagen representativa de los ensayos realizados para evaluar cual correspondería al tiempo de incubación del ABTS de la técnica. Como se observa, las muestras blanco (sin lisado celular) y control (lisado de células sin infectar), mostraron niveles de absorbancia significativamente menores en relación con los lisados de células infectadas y, por tanto, con presencia de proteína M1. Sin embargo, también podemos observar que la absorbancia fue incrementando conforme pasó más tiempo de incubación, mientras que los controles negativos no incrementaron su absorbancia de manera apreciable. Por esta razón se decidió considerar los resultados al tiempo de 40 min para todos los ensayos.

De esta manera, el formato para los ensayos de ELISA para la proteína viral M1 quedó como sigue:

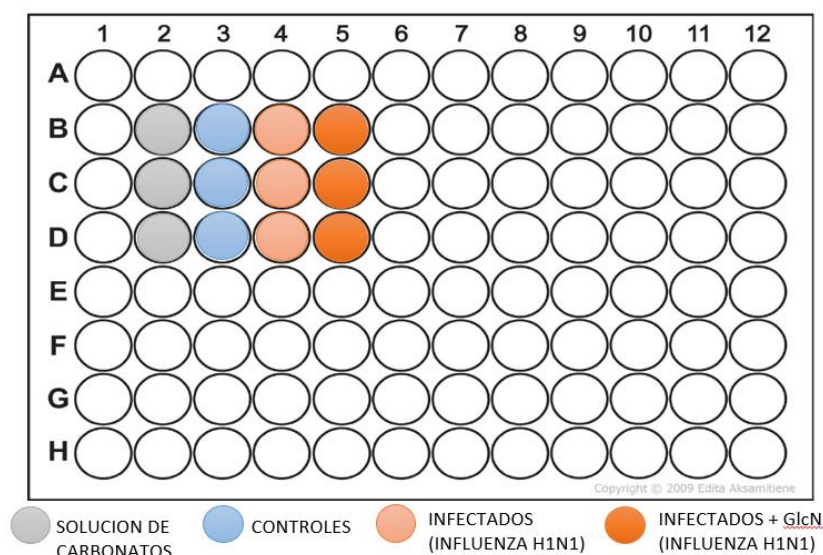


Figura 22. Esquematación de la colocación de los lisados obtenidos para ELISA. Donde podemos observar que en color gris tenemos una solución de carbonatos siendo nuestro blanco; en color azul tenemos los lisados controles, es decir aquellos que no tienen infección alguna; el color naranja tenue son los lisados con infección por el virus de influenza A H1N1, mientras que los color naranja sólido, son los lisados con infección de influenza A H1N1 pero con un tratamiento de glucosamina a 10mM.

Para confirmar que la línea celular empleada A549 se infectó con el virus de Influenza A H1N1 (New Caledonia/99), se evaluó la presencia de la proteína viral M1 en los lisados celulares obtenidos del cultivo realizado mediante la técnica de ELISA (debido a problemas para poder llevar a cabo western blot). Para estos ensayos, como se muestra en la Figura 22, se colocó la cantidad de 10 µg de proteína correspondiente a las diferentes muestras de lisados obtenidos, en ensayos por triplicado. Donde de los pozos B a D, de la columna 2, se le agregó 200 µl de NaHCO₃ 100 mM y se consideraron como el blanco. En los pozos B a D de la columna 3, se colocó 10 µg de la muestra control, es decir, aquella que tenía lisado de células sin infección (control); mientras que en los pozos B a D de la columna 4, se colocaron 10 µg del lisado de células infectadas con el virus de Influenza A H1N1 y en la columna 5 en los pozos B a D la muestra infectada con el tratamiento de Glucosamina (10 mM) con la misma cantidad de 10 µg.

Una vez colocadas las muestras, se selló la caja con plástico y se almacenó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó la placa 2 veces con 200 µl de PBS-Tween al 0.05% (PBS-T), cada lavado realizado por 5 minutos. Terminados los lavados se retiró el exceso de PBS-T y para evitar que quedaran residuos se golpeó la caja sobre un papel absorbente. A continuación, se bloquearon los pozos con una solución de leche al 5% en PBS-T, colocándose 200 µl por pozo y dejándose durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurridas las 2 horas del bloqueo, se retiró la leche y se realizaron nuevamente 2 lavados con PBS-T por 5 minutos, posteriormente se agregó 100 µl de anticuerpo para proteína viral M1 (anticuerpo primario) y se dejó incubando durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Al pasar las 2 horas, se retiró el anticuerpo y se realizaron 2 lavados con PBS-T durante 5 minutos. Después de esto, se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado con HRP, el cual se colocó en leche con una dilución de 1:1000; y se agregaron 100 µl de esta solución a cada pozo, donde se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Para el revelado, una vez transcurrida la hora, se retiró la solución con anticuerpo secundario y se realizaron 2 lavados con PBS-T durante 5 minutos, para a continuación agregar 100 µl de ABTS (Sigma) por 40 minutos en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad, donde se realizaron lectura para 10 minutos en el lector de placas EPOCH (espectrofotómetro) a 405 nm y con corrección de 650 nm de longitud de onda.

Para la obtención de datos, una vez terminada la lectura, se transfirieron los datos a un formato Excel.

6.9. Evaluación de la O-GlcNAcilación

Previo a la evaluación de la O-GlcNAcilación, se determinó la concentración de proteínas mediante el microensayo de Bradford (Bio Rad), empleando albúmina sérica bovina (BSA), como referencia de proteína. Posteriormente, se emplearon 15 µg de proteína derivados de los lisados celulares fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras. Posteriormente, las proteínas incluidas en el gel de poliacrilaminda fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0.2µm (Bio Rad). Para inmunodetección de O-GlcNAcilación, se empleó el anticuerpo monoclonal RL2

(BioLegend) en una dilución 1:3000 en presencia de una solución de PVP al 5% como agente bloqueador. Los blots fueron revelados en el equipo LI-COR del Laboratorio 5 de la Dra. Lourdes Gutierrez Xicotencatl del CICEI en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) del Estado de Morelos, con la asesoría del Dr. Adolfo Pedroza Saavedra. Como control de que se transfirió cantidades similares de proteína en los diferentes carriles del gel, en ensayos en paralelo se incubó con anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotech.) a una dilución 1:5000 en solución de leche para bloqueo al 5% y como anticuerpo secundario se utilizó HRP-anti-ratón (Santa Cruz Biotech.) a una dilución de 1:1000 en una solución de PVP al 5% para el caso de O-GlcNAc y en solución de leche al 5% para el caso de actina.

6.10. Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva, empleando medias y desviación estándar. Cada ensayo de infección fue realizado por triplicado (pozos independientes) y fue verificado en al menos otro ensayo por triplicado. Para la comparación entre condiciones y grupos de experimentación, se empleó la prueba de Mann Whitney para datos no paramétricos, considerando una $p < 0.05\%$. Para los gráficos y análisis estadísticos se empleó el programa Prism v.9.2. (GraphPad).

7. RESULTADOS

7.1. Infección viral *in vitro*.

Para comprobar la infección en células A549 por el virus de Influenza A H1N1 se realizaron ensayos de infección cuyo proceso se describió en el apartado de métodos, y posteriormente, los lisados celulares obtenidos fueron analizados por ELISA debido a la falta de equipo para realizar Western Blot y también debido a la pandemia ya que no podíamos solicitar un equipo en otra institución por el límite de estudiantes que se requería por la contingencia. Como se puede observar en la Figura 23, la absorbancia observada en ausencia de proteína (Blanco) o con 10 µg de lisado de células sin infectar (control), mostraron un

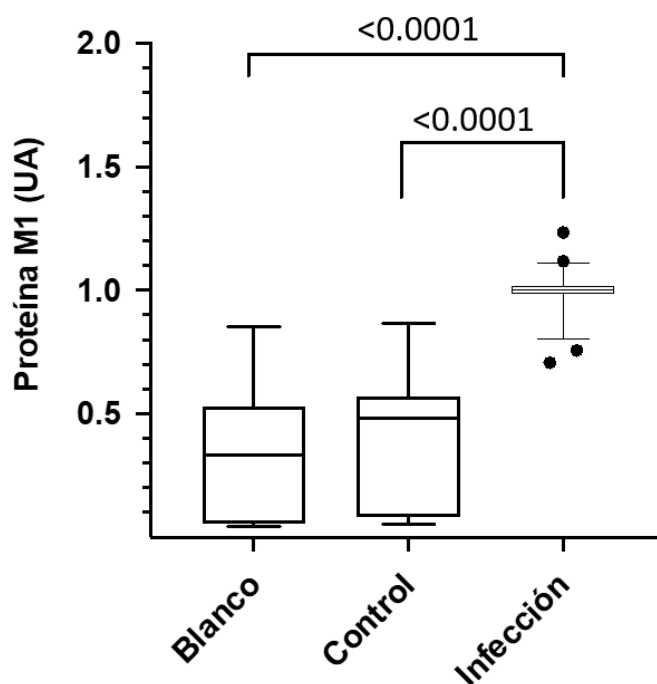


Figura 23. Niveles comparativos de M1 entre células infectas por VIA y células sin infectar (Control).

Células A549 fueron incubadas por 48 hrs post-infección en las diferentes condiciones de tratamiento, donde las células Control, corresponde a células sin infectar. Posterior al tiempo de infección, las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y la misma cantidad de proteína (10 µg) de cada condición de tratamiento fue evaluada por ELISA para la proteína M1. Primeramente, los valores de absorbancia de 405 nm, fueron ajustados a 650nm. Posteriormente, los valores fueron normalizados al nivel de las células infectadas de cada experimento y representados en forma de Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se empleó la prueba de Mann Whitney para comparar entre condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Los resultados corresponden a 22 ensayos independientes. GlcN, glucosamina; ns, no significativo; UA, unidades arbitrarias.

valor promedio de absorbancia de 0.325 ± 0.27 y 0.362 ± 0.28 Unidades Arbitrarias (UA). Por su parte, los lisados de células infectadas mostraron un promedio de absorbancia de 0.992 ± 0.11 , resultado que fue significativamente superior a las condiciones blanco y control ($p < 0.0001$). Esto pone en evidencia que la técnica de ELISA es suficiente sensible para diferenciar células infectadas de aquellas sin expresión de la proteína M1.

7.2. Efecto de TGF- β sobre la infección viral por Influenza H1N1.

Para evaluar el efecto de TGF- β sobre la infección por VIA se realizaron ensayos de infección donde se añadió el TGF- β , como se describe en los antecedentes de nuestro grupo de investigación (BustosRivera-Bahena., et al. 2021) previo a la infección viral. En la Figura 24 se observan los resultados de múltiples ensayos independientes (>20) realizados en paralelo con diferentes tratamientos. Como se observa en la Figura 24, el nivel de M1 en las células infectadas fue de 0.99 ± 0.106 UA, mientras que el nivel de la proteína viral pretratadas con TGF- β fue de 1.246 ± 0.235 UA. Tras comparar las dos condiciones mediante la prueba de t de student para resultados que no siguen una distribución normal (Mann Whitney) se confirmó que las medias fueron significativamente diferentes (<0.0001).

Estos resultados sugieren que, a pesar de la variación experimental, el pre-tratamiento con TGF- β indujo un incremento en los niveles de la proteína M1 tras la infección por el virus.

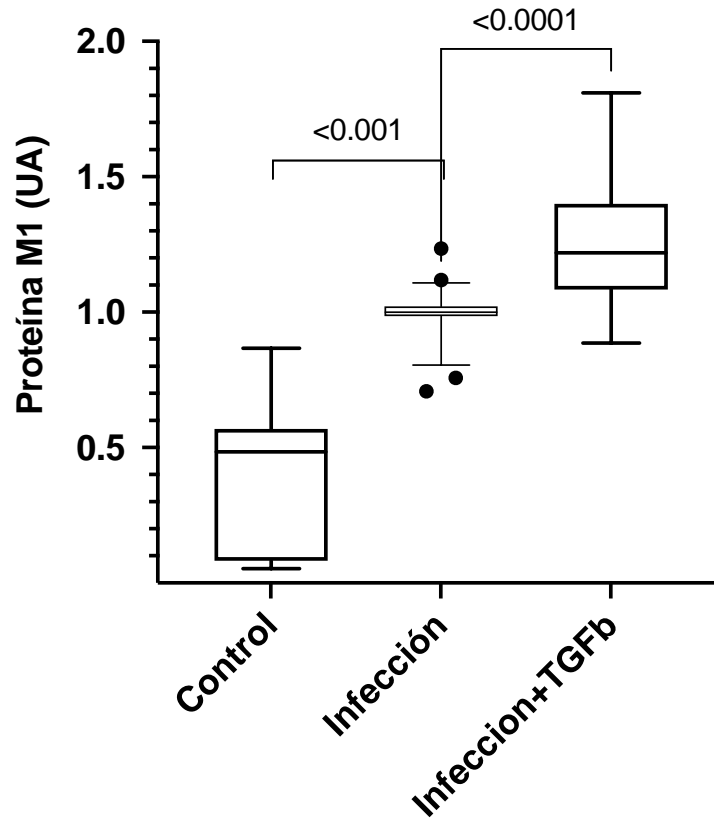


Figura 24. Efecto del tratamiento por TGF- β sobre la infección por VIA. Células A549 fueron incubadas por 48 hrs post-infección en las diferentes condiciones de tratamiento, donde las células Control, corresponde a células sin infectar. Horas post-infección, las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y la misma cantidad de proteína (10 μ g) de cada condición de tratamiento fue evaluada por ELISA para la proteína M1. Primeramente, los valores de absorbancia de 405 nm, fueron ajustados a 650nm. Posteriormente, los valores fueron normalizados al nivel de las células infectadas de cada experimento y representados en forma de Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se empleó la prueba de Mann Whitney para comparar entre condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Los resultados corresponden a 25 ensayos independientes. UA, unidades arbitrarias.

Hay que indicar que a pesar de estandarizar varias de las condiciones de la técnica de ELISA para la proteína M1, se obtuvieron resultados variables entre diferentes ensayos, por lo que se normalizaron los ensayos en base a los niveles de M1 en las células infectadas. Esto se hace evidente porque es la única condición donde se observa una menor variabilidad experimental.

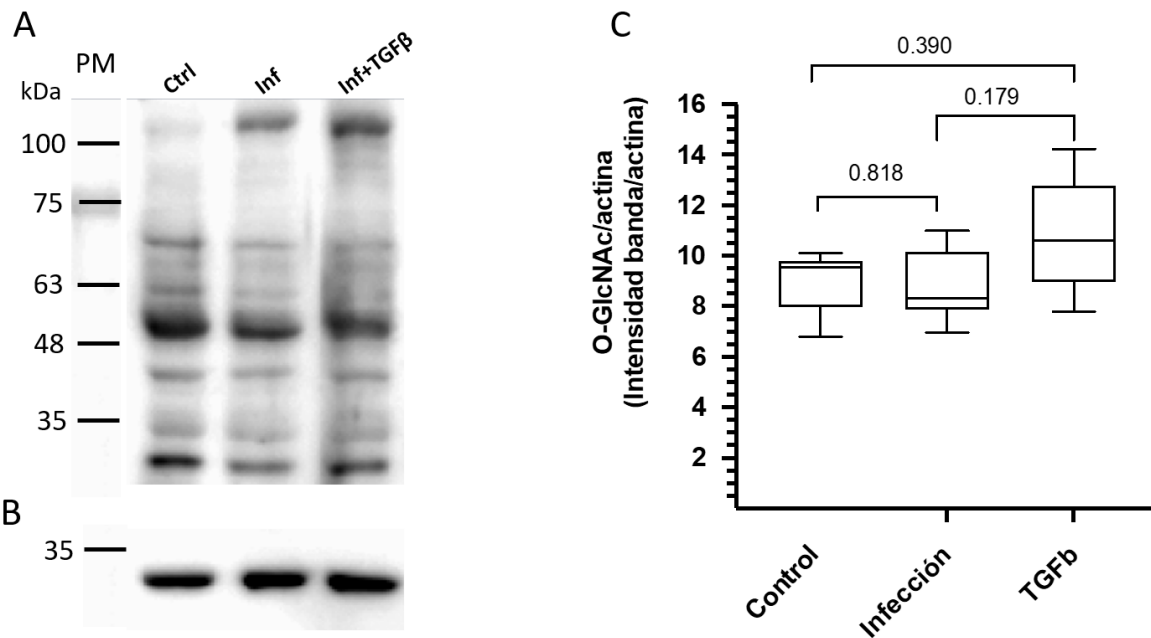


Fig. 25. Efecto del tratamiento independiente y conjunto de TGF- β e infección por VIA sobre la O-GlcNAcilación. A. Análisis representativo de evaluación de O-GlcNAcilación por WB de los lisados celulares bajo las diferentes condiciones de tratamiento. Las bandas inmunorreactivas para el anticuerpo RL2 fueron reveladas por quimioluminiscencia. B. WB para β -actina de lisados celulares y se empleó como control de carga de proteína de cada experimento. Para la comparación entre condiciones, se determinó la intensidad en píxeles/mm² del carril de cada experimento y se ajustó en base la intensidad relativa de la banda de β -actina. C. Análisis estadístico de resultados de densitometría. Resultados corresponden a 6 experimentos independientes. kDa, kiloDaltones; PM, pesos moleculares de los estándares; Ctrl, Control; Inf, infección; Inf+TGF β , Infección más tratamiento de TGF- β .

Por otro lado, al evaluar el efecto del pretratamiento con TGF- β sobre la O-GlcNAcilación se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 25. En la Figura 25A se observa una imagen representativa de la imagen del western blot para las proteínas O-GlcNAcyladas, en la 25B se observa un WB para actina, esto usado como control de carga y asegurarse de que los carriles estaban siendo cargados con la misma cantidad de proteína, mientras en la Figura 25C se representan los resultados comparativos del análisis densitométrico de todo el carril (35 a 130 kDa).

Inicialmente, en la Figura 25A se observa que el anticuerpo L2 es inmunorreactivo a proteínas de diferentes pesos moleculares (entre 11 y 16 bandas). Asimismo, al comparar las células control (sin infectar) con las células infectadas que algunas bandas fueron más intensas o gruesas en las condiciones control (25, 52, 60 y 70 kDa), mientras que la infección viral incrementó la intensidad de las bandas correspondiente al peso molécul de 120 kDa.

Como se observa en la Figura 25C, después de evaluar la intensidad de pixeles correspondiente al carril completo, se observó un valor promedio de 9.01 ± 1.24 UA para las células control y de 8.77 ± 1.43 UA para las células infectadas. Al evaluar por la prueba de t student la diferencia entre ambos ensayos, se obtuvo una $p=0.818$, lo cual sugiere que no hay diferencia estadística entre ambas condiciones. Es importante mencionar que estos datos resultan de 6 ensayos de western blot diferentes. Hay que recordar que, como se describió en metodología, el análisis densitométrico no solamente consideró la intensidad de pixeles a lo largo de todo el carril, sino que se normalizó en base a la intensidad de la banda de β -actina.

Por el otro lado, el tratamiento con TGF- β , previo a la infección, indujo un incremento en la intensidad de algunas de las bandas del perfil de proteínas inmunorreactivas para el anticuerpo RL2. Sobre todo, hay que considerar las proteínas en la región entre 80 y 120-30 kDa. Al comparar los 6 experimentos independientes realizados se observó un nivel de la intensidad de las bandas de 10.81 ± 2.35 UA, que fue casi 2 unidades mayor que el valor de las condiciones de infección. Sin embargo, al aplicar la prueba de Mann Whitney no se alcanzó diferencia estadística entre ambas condiciones ($p=0.179$), indicando que no hay elementos suficientes para decir que son efectos diferentes. A este respecto, hay que tomar en cuenta que el tratamiento con TGF- β mostró mayor variación experimental en comparación al perfil de las proteínas inmunorreactivas de células infectadas y posiblemente por eso, no se pudo alcanzar la significancia estadística.

7.3. Efecto de la GlcN sobre la infección viral por virus Influenza A H1N1.

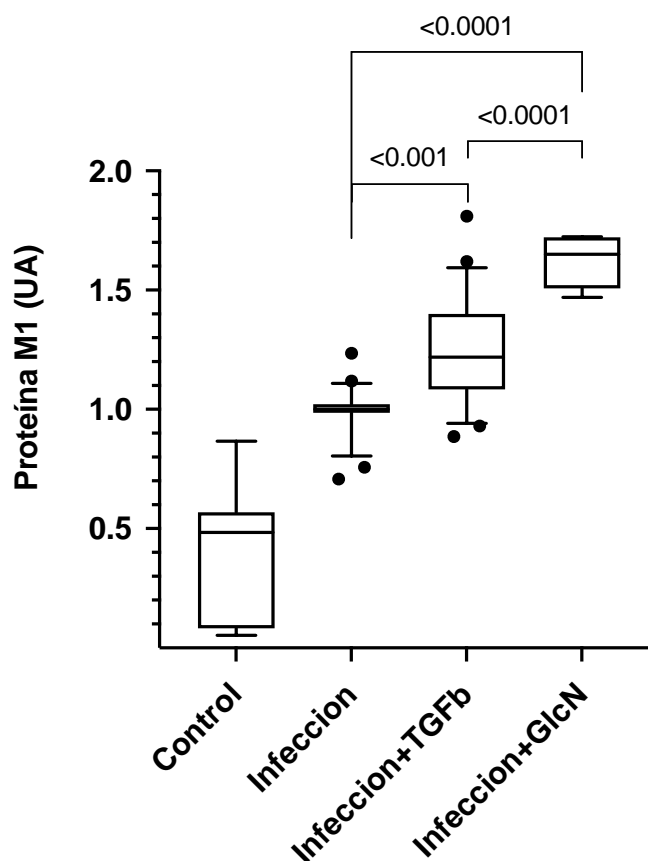


Figura 26. Efecto del tratamiento con GlcN sobre la infección por VIA. Tiempo post-infección, las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y la misma cantidad de proteína (10 μ g) de cada condición de tratamiento fue evaluada por ELISA para la proteína M1. Primeramente, los valores de absorbancia de 405 nm, fueron ajustados a 650nm. Posteriormente, los valores fueron normalizados al nivel de las células infectadas de cada experimento y representados en forma de Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se empleó la prueba de Mann Whitney para comparar entre condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Los resultados corresponden a 6 ensayos independientes. GlcN, glucosamina; ns, no significativo; UA, unidades arbitrarias.

En la Figura 26 se muestran los resultados de 6 ensayos independiente realizados para evaluar el efecto de GlcN sobre la infección viral. El nivel promedio de la proteína M1 fue de 1.62 ± 0.111 , muy superior a los niveles de M1 en células infectadas (0.99 ± 0.106 UA) y células pretratadas con TGF- β y, después infectadas con VIA (1.246 ± 0.235 UA). Consecuentemente, al evaluar por la prueba de Mann Whitney pudimos confirmar que los niveles de M1 fueron significativamente superiores como respuesta al tratamiento de GlcN con respecto a las células infectadas ($p < 0.0001$) o a las células TGF- β +VIA ($p = 0.0016$). Es

por eso que se puede sugerir que la incubación con GlcN tuvo un efecto claramente estimulador de la infección viral, en base a la síntesis de proteínas virales.

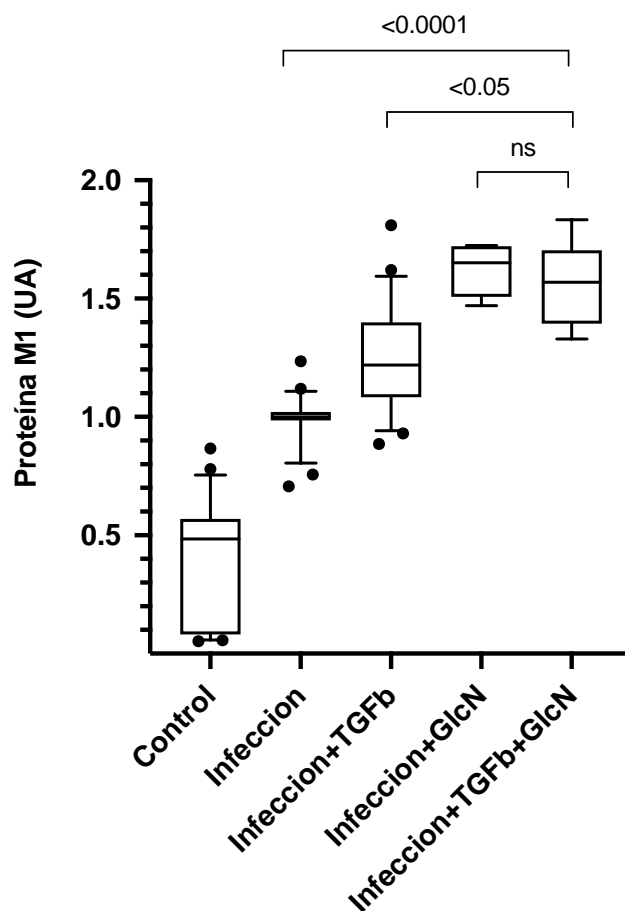


Figura 27. Efecto de co-tratamiento de TGF- β y GlcN sobre la infección viral. Células A549 fueron incubadas por 48 hrs post-infección en las diferentes condiciones de tratamiento, donde las células Control, corresponde a células sin infectar. Tiempo post-infección, las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y la misma cantidad de proteína (10 μ g) de cada condición de tratamiento fue evaluada por ELISA para la proteína M1. Primeramente, los valores de absorbancia de 405 nm, fueron ajustados a 650nm. Posteriormente, los valores fueron normalizados al nivel de las células infectadas de cada experimento y representados en forma de Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se empleó la prueba de Mann Whitney para comparar entre condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Los resultados corresponden a 6 ensayos independientes. GlcN, glucosamina; ns, no significativo; UA, unidades arbitrarias.

Como se observa en la Figura 27, el co-tratamiento entre TGF- β y GlcN no indujo un cambio estadísticamente significativo en los niveles de M1, en comparación al efecto de la GlcN por si sola. Es cierto que los niveles son significativamente superiores a los inducidos por el tratamiento sólo con TGF- β ($p=0.05$) o sólo con la infección ($p < 0.0001$), pero dado

que el nivel fue similar al obtenido sólo con la presencia de GlcN consideramos que, en este ensayo en particular, el TGF- β parece no jugar un papel aparente. Situación que será diferente al evaluar los inhibidores de las enzimas responsables de la O-GlcNAcilación.

En la Figura 28 se observan los resultados del efecto comparativo de GlcN sobre la O-GlcNAcilación en células A549. Inicialmente, en la Figura 28A se muestra un análisis de WB representativo para evaluar los niveles de las proteínas O-GlcNAcizadas. A ese respecto, se logra ver un incremento en la intensidad de la banda que corresponde a la región de peso molecular entre 63-48 kDa, de la condición del control en comparación de la condición del infectado. Sin embargo, se observa una mayor intensidad en las bandas con peso molecular superior a 100 kDa en las células infectadas a comparación del control. Algo similar sucede con la banda que está por debajo de 35 kDa. Mientras que, para las condiciones con el tratamiento de TGF- β en las bandas correspondientes a 100 y por debajo de 35 kDa muestran una mayor intensidad en comparación con el INF+GlcN e INF+TG, pero, en la banda entre 63-48 kDa se observa una mayor intensidad en las condiciones INF+TGF β e INF+TG en comparación con INF+GlcN. En la Figura 28B se muestra el WB incubado para anticuerpo anti-b-actina para comprobar que efectivamente se estaba cargando la misma cantidad de proteína en cada uno de los carriles. Sin embargo, como se observa, hay variaciones observables entre los carriles, donde las condiciones control, Infectado+TGF- β son quienes parecen tener mayor concentración.

Como se describió antes, los resultados del análisis desitométrico se recolectaron para todos los carriles entre los pesos moleculares de 35 a 130 kDa y se realizó un análisis estadístico cuyo resultado puede observarse en la Figura 28C. Para las condiciones control se observó un nivel de densidad en pixeles de 9.01 ± 1.24 UA, para el control, y de 8.77 ± 1.43 , para las células infectadas, lo que sugirió que no hay un cambio en la O-GlcNAcilación de las proteínas entre el grupo control y el grupo infectado. Por otra parte, se observó un incremento en el promedio de intensidad de las bandas en la condición con TGF- β (10.81 ± 2.35 UA), pero al compararlo con las condiciones de infección no pudimos confirmar una diferencia significativa. Por otro lado, al tratar las células infectadas con GlcN, obtuvimos un nivel promedio de intensidad de bandas de 9.28 ± 2.37 UA. Al evaluar estadísticamente, confirmamos que el incremento observado no alcanzó significancia estadística, por lo que se podría sugerir que, en nuestras condiciones de ensayo, el tratamiento

sólo con GlcN no significó un cambio en los niveles de O-GlcNAcilación. Por el otro lado, al conjuntar los tratamientos de TGF- β y GlcN logramos ver que hay un incremento en la O-GlcNAcilación de las proteínas hasta alcanzar 12.88 ± 3.88 UA, que podría alcanzar significancia estadística.

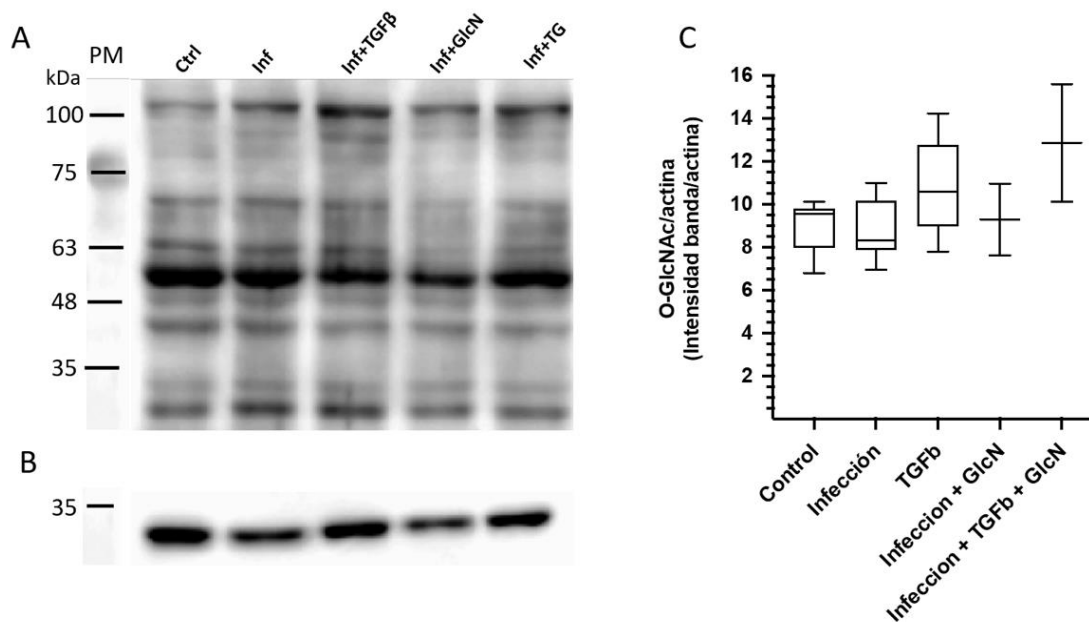


Figura 28. Efecto del tratamiento independiente y conjunto de GlcN y TGF- β sobre la O-GlcNAcilación durante infección por VIA. A. Análisis representativo de evaluación de O-GlcNAcilación por WB de los lisados celulares bajo las diferentes condiciones de tratamiento. Las bandas inmunorreactivas para el anticuerpo RL2 fueron reveladas por quimioluminiscencia. B. WB para β -actina de lisados celulares y se empleó como control de carga de proteína de cada experimento. Para la comparación entre condiciones, se determinó la intensidad en pixeles/mm² del carril de cada experimento y se ajustó en base la intensidad relativa de la banda de β -actina. C. Análisis estadístico de resultados de densitometría. Resultados corresponden a 6 experimentos independientes para Ctr, Inf y TGF β +Inf, resultados corresponden a 2 experimentos independientes para Inf+GlcN y TG/Inf/Glc. kDa, kiloDaltones; PM, pesos moleculares de los estándares; Ctrl, Control; Inf, infección; Inf+TGF β , Infección + TGF- β ; Inf+GlcN, infección + GlcN; Inf+TG, Infección + TGF- β + GlcN.

Sin embargo, por las limitaciones técnicas referidas previamente, sólo fue posible completar 2 ensayos independientes para esto experimentos en particular, por lo que no pudimos aplicar pruebas estadísticas para evaluar el efecto cuantitativo entre los diferentes experimentos. Sin embargo, hay que manifestar que los dos ensayos realizados mostraron resultados muy similares por lo que, a pesar de un tercer experimento, muy posiblemente los resultados esperados serán similares.

7.4. Efecto del inhibidor OSMI-I sobre la expresión de la proteína viral M1 por infección del virus de Influenza H1N1.

Para comprobar la relación entre la O-GlcNAcilación y la infección viral, se evaluó el efecto del inhibidor de OGT (OSMI-I) de acuerdo con las condiciones de infección ya preestablecidas. Inicialmente, se evaluó el efecto del inhibidor sobre los niveles de la proteína viral M1. En la Figura 29 se observan la compilación de 12 y 7 experimentos para el tratamiento de Infección+OSMI-1 y TGF- β +Infección+OSMI-1.

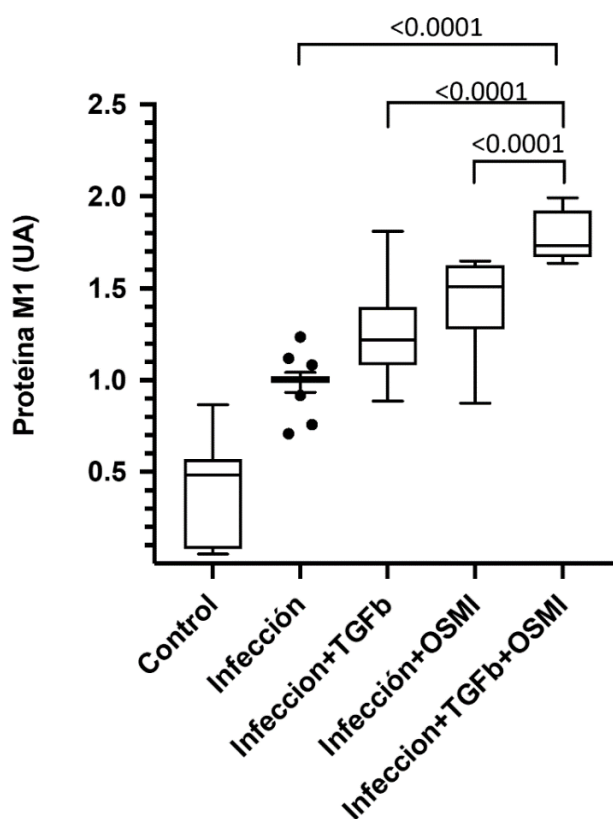


Figura 29. Efecto del inhibidor OSMI-I sobre infección por VIA con o sin tratamiento con TGF- β . Se incubaron células A549 las cuales fueron infectadas por VIA, con 48 hrs post-infección, con diferentes condiciones de tratamiento; células Control, las cuales son aquellas que no fueron infectadas. Infección, aquellas que fueron infectadas por VIA, Infección+TGF β , aquellas que fueron infectadas por VIA y tratadas con TGF β , Infección+OSMI, células infectadas con inhibidor de OGT, Infección+TGF β +OSMI, células infectadas con VIA, más tratamiento con TGF β e inhibidor de OGT. Posterior a las 48 hrs las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y se colocó la misma cantidad de proteína (10 microgramos) para cada condición de tratamiento los cuales fueron evaluados por ELISA para la proteína viral M1. Se hizo una lectura a 405 nm y fue ajustada a 650 nm. Posteriormente los valores fueron normalizados al nivel de la condición de las células infectadas de cada experimento, los cuales se representan en Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se realizó la prueba de Mann Whitney para comparar las condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Se realizaron 12 y 7 ensayos para Infección+OSMI e Infección+TGF β +OSMI-1, respectivamente.

Inicialmente, para el tratamiento de infección+OSMI-1 obtuvimos un nivel promedio de 1.43 ± 0.24 y para el tratamiento conjunto de TGF- β +OSMI-1, encontramos un nivel de 1.78 ± 0.135 . En ambos casos, los niveles de M1 fueron significativamente superiores a la infección sola o el pre-tratamiento con TGF- β ($p < 0.001$, ***). En base a esto, se podría sugerir que la inhibición de la enzima OGT incrementa los niveles de la proteína viral M1 y, por tanto, sugiere que la O-GlcNAcilación afecta la infección viral.

Hay que considerar, sin embargo, que el tratamiento conjunto de TGF- β + OSMI-1 (1.78 ± 0.135) fue superior a los tratamientos individuales para TGF- β (1.25 ± 0.23) o para OSMI-1 (1.43 ± 0.24). Al realizar la prueba estadística de Mann Whitney obtuvimos una $p < 0.0001$, lo que nos sugiere un efecto aditivo entre TGF- β y la inhibición de OGT para incrementar los niveles de M1 durante la infección viral.

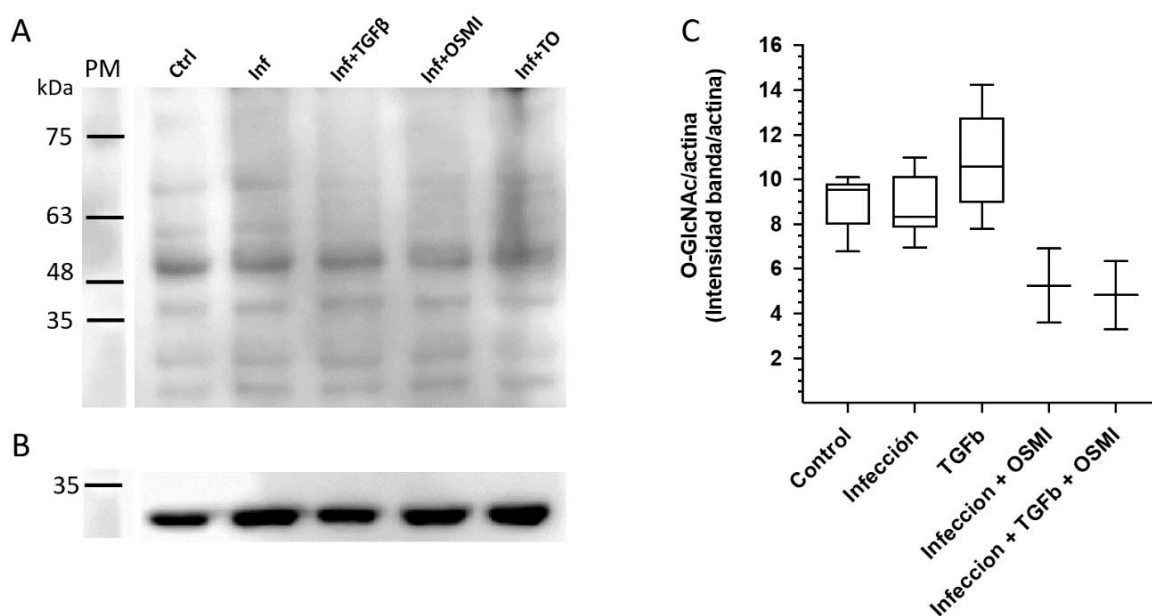


Figura 30. Efecto del inhibidor OSMI-I sobre la O-GlcNAcilación en infección por VIA con o sin tratamiento con TGF- β . A. WB incubado con O-GlcNAc, donde se observan las bandas de aquellas proteínas que están siendo O-GlcNAciladas en las diferentes condiciones ya mencionadas. B. WB incubado con β -actina como control de carga. C. Grafica representativa del análisis de los datos obtenidos. A. Análisis de WB de los lisados celulares para los tratamientos Control, Infección con VIA y pre-tratamiento con TGF- β e infección. Las bandas inmunorreactivas para el anticuerpo RL2 fueron reveladas por quimioluminiscencia. B. WB para β -actina de lisados celulares y se empleó como control de carga de proteína de cada experimento. Para la comparación entre condiciones, se determinó la intensidad de pixeles/mm² del carril de cada experimento y se ajustó en base la intensidad relativa de la banda de β -actina. C. Análisis estadístico de resultados de densitometría. Resultados corresponden a 6 experimentos independientes. kDa, kiloDaltones; PM, pesos moleculares de los estándares; Ctrl, Control; Inf, infección; Inf+TGF β , Infección más tratamiento con TGF- β ; Inf+TO, infección más tratamiento con TGF- β más inhibidor OSMI-I (Inhibidor de OGT).

Así mismo se realizaron análisis de WB evaluar el efecto del inhibidor de OGT sobre los niveles de O-GlcNAcilación. En la Figura 30 se puede observar los resultados representativos del empleo del inhibidor de OGT (OSMI-1) sobre los niveles de O-GlcNAcilación. Como en análisis previos (Figuras 25 y 28) los niveles de la inmunorreactividad de las bandas al anticuerpo RL2 fue ligeramente mayor en células infectadas e infectadas y pretratadas con TGF- β ; aunque sin alcanzar significancia estadística. Por su parte, en las condiciones infección + OSMI-1 e infección + TGF- β + OSMI-1, las bandas entre los pesos moleculares de 75-63 kDa son más tenues en comparación a la condición infección, lo que sugiere que cada condición tiene un efecto sobre estas proteínas. Por su parte, en la Figura 30B se observa el control de carga de proteína para los diferentes carriles del WB, empleando la inmunorreactividad para β -actina.

Por su parte, en base a los dos ensayos independientes realizados con el inhibidor OSMI-1 se observó un nivel de O-GlcNAcilación de 5.26 ± 2.34 cuando se evaluó su efecto individual sobre la infección viral. Por su parte, el efecto conjunto de TGF- β + OSMI-1, durante la infección viral mostró un nivel relativo de O-GlcNAcilación de 4.83 ± 2.15 . Como era de esperarse, el empleo del inhibidor de OGT mostró un claro efecto sobre la inhibición de O-GlcNAcilación, tanto de manera individual como en conjunto con TGF- β . De esta manera, se puede sugerir que el cambio de los niveles de O-GlcNAcilación durante la infección viral fueron claramente disminuidos por el efecto del inhibidor. Asimismo, el efecto del TGF- β parece ser minoritario, porque a diferencia de la Figura 25 donde sugiere un efecto estimulador de la O-GlcNAcilación, este fue bloqueado por este inhibidor. Como se mencionó antes, estos resultados corresponden a dos ensayos independientes, por lo que no se pudo aplicar pruebas estadísticas para comparar los resultados. El efecto que tenían los diferentes tratamientos mencionados previamente sobre la O-GlcNAcilación cuyos resultados se muestran en la figura 30.

7.5. Efecto del inhibidor PUGNAc sobre la expresión de la proteína viral M1 por infección del virus de Influenza H1N1.

Por la otra parte, también se propuso evaluar el efecto de la inhibición de la enzima OGA, para lo cual se empleó la molécula PUGNAc. De esa manera, como se escribe en Material y Métodos, las condiciones infección e infección con pre-tratamiento con TGF- β fueron realizadas en ausencia y presencia de PUGNAc por el mismo tiempo post-infección. Al final, los lisados celulares fueron evaluados en base a los niveles de la proteína viral M1 y O-GlcNAcilación de proteínas.

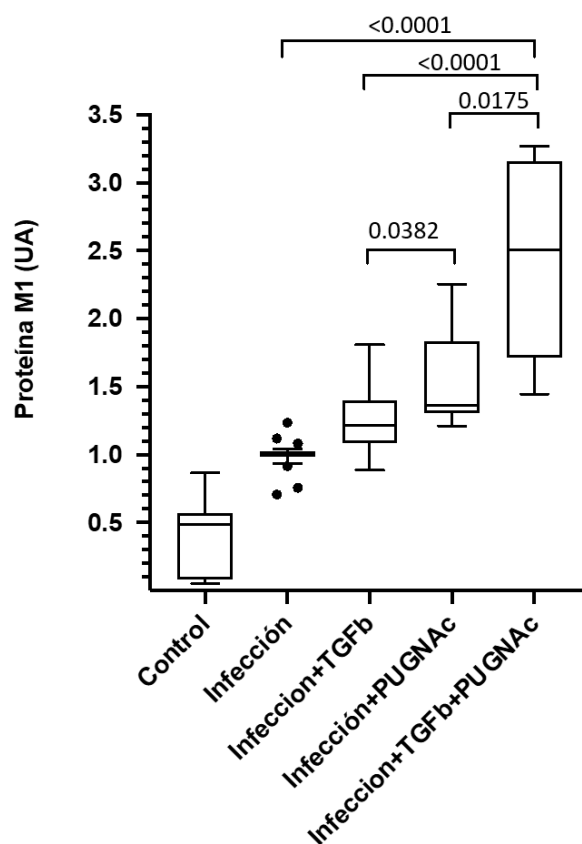


Figura 31. Efecto de Inhibidor PUGNAc ante infección por VIA con o sin tratamiento con TGF- β . Se incubaron células A549 las cuales se infectaron con VIA, a 48 hrs post-infección, en diferentes condiciones de tratamiento; células Control, las cuales corresponden a aquellas que no fueron infectadas; Infección, aquellas que fueron infectadas por VIA, Infección+TGF β , aquellas que fueron infectadas por VIA y tratadas con TGF- β ; Infección+PUGNAc, células infectadas con inhibidor de OGA; Infección+TGF β +PUGNAc, células infectadas con VIA, más tratamiento con TGF- β e inhibidor de OGA. 48 hpi las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y se colocó la misma cantidad de proteína (10 microgramos) para cada condición de tratamiento los cuales fueron evaluados por ELISA para la proteína viral M1. Se hizo una lectura a 405 nm y fue ajustada a 650 nm. Posteriormente los valores fueron normalizados al nivel de la condición de las células infectadas de cada experimento, los cuales se representan en Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se realizó la prueba de Mann Whitney para comparar las condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Se realizaron 14 ensayos.

La Figura 31 muestra la compilación de 14 experimentos independientes donde se evaluó el efecto de PUGNAc sobre los niveles de expresión de la proteína viral M1. En la Figura se muestran las condiciones antes descritas: control, infección + TGF- β (Figuras 23, 24, 26 y 27). Para el caso de células incubadas con PUGNAc e infectadas se obtuvo un nivel promedio de M1 de 10.87 ± 1.56 , mientras que la condición conjunta de PUGNAc y TGF- β mostró un nivel de M1 de 12.78 ± 1.39 . Como se puede observar en la Figura 31, al comparar la condición de Infección + TGF β con aquella de Infección + PUGNAc obtuvimos una significancia estadística (p) de 0.0382, sugiriendo que los niveles de M1 fueron superiores a la infección sola o el pre-tratamiento con TGF- β . Por su parte, la estimulación conjunta de TGF- β e inhibición de la enzima OGA significó los niveles más altos de M1, significativamente superiores a la infección sola ($p < 0.001$), infección + TGF- β ($p < 0.0001$) e infección + PUGNAc ($p = 0.017$).

En la Figura 32 se observa un análisis comparativo de los efectos de los inhibidores de enzimas OGT u OGA sobre los niveles de la proteína viral M1, durante el curso de infección viral. Como se puede observar, las condiciones control e infección fueron similares a las aquí mostradas. Por su parte, al comparar los niveles promedio de la proteína M1 fue de 1.431 ± 0.24 UA, para la condición de Infección + OSMI-1; mientras tanto, los niveles fueron de 1.437 ± 0.42 UA. En ambos casos se observó una diferencia significativa al comparar con los niveles de M1 viral por la simple infección (0.001 y 0.0043, para OSMI-1 y PUGNAc, respectivamente). Sin embargo, el efecto estimulador de los niveles de M1 durante el proceso infectivo, no fue diferente al comparar el efecto de estos dos inhibidores (no significativo). De estos resultados se puede sugerir que el efecto de la modificación de la O-GlcNAcilación, ya sea por inhibición de OGT u OGA resulta en la estimulación de los niveles de M1 durante la infección viral.

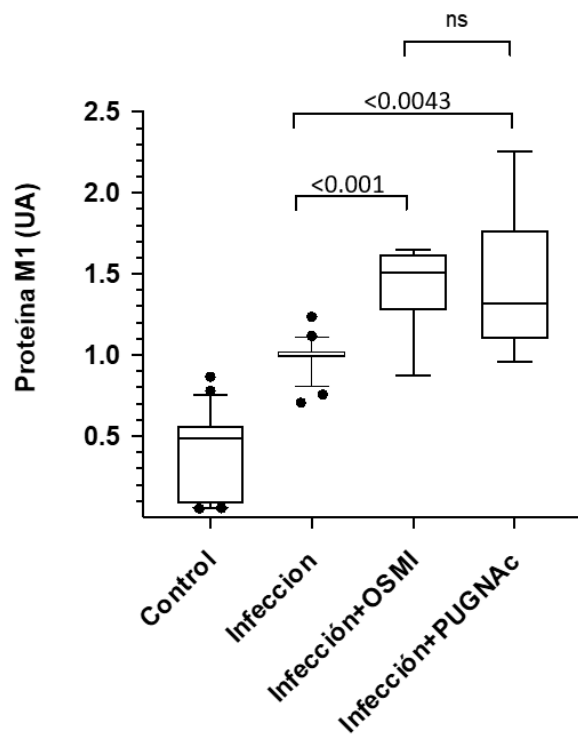


Figura 32. Efecto de los inhibidores OSMI-I/PUGNAc sobre la infección por virus Influenza. Se incubaron células A549, las cuales se infectaron con VIA, a 48 hrs post-infección, en diferentes condiciones de tratamiento; células Control, las cuales corresponden a aquellas que no fueron infectadas, Infección, aquellas que fueron infectadas por VIA y las infecciones en conjunto con la incubación con inhibidores de OGT (OSMI-1) u OGA (PUGNAc). Posterior a las 48 hrs las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y se colocó la misma cantidad de proteína (10 microgramos) para cada condición de tratamiento los cuales fueron evaluados por ELISA para la proteína viral M1. Se hizo una lectura a 405 nm y fue ajustada a 650 nm. Posteriormente los valores fueron normalizados al nivel de la condición de las células infectadas de cada experimento, los cuales se representan en Unidades Arbitrarias (UA) para todos los casos. Se realizó la prueba de Mann Whitney para comparar las condiciones, considerando una $p < 0.05\%$. Se realizaron 12 ensayos para OSMI y 9 ensayos para PUGNAc.

En la Figura 33 se muestra los ensayos para evaluar el efecto de la inhibición de OGA sobre la infección viral y la O-GlcNAcilación de proteínas. Como en las Figuras previas, la Figura 33A corresponde a la imagen representativa de un WB de proteínas O-GlcNAcizadas, la Figura 33B corresponde al control de carga de proteína, considerando la presencia de b-actina. Por su parte, en la Figura 33C se muestran los resultados de experimentos independientes. Como en los ensayos previos, el perfil de O-GlcNAcilación en células A549 mostró 11-18 bandas de proteína, mostrando amplia variación en su abundancia relativa. Al comparar la intensidad de las bandas en relación con las diferentes condiciones experimentales, se observa que esta se incrementa por la infección a prácticamente todos los pesos moleculares, pero las proteínas entre 80 y 110 kDa evidencian un incremento muy

marcado, lo que sugiere que estas proteínas O-GlcNAcizadas están siendo alteradas por la infección por VIA. Situación que se observó en experimentos previos de infección. Por otro lado, como esperábamos, la inhibición de la enzima OGA llevó al incremento de las proteínas O-GlcNAcizadas de 70 a 110 kDa. Por su parte, la Figura 33B muestra que la presencia de β -actina fue *grosso modo* similar en todos los carriles, lo cual sugiere que la comparación visual simple de la Figura 34A nos proporciona una idea cercana al análisis desitométrico.

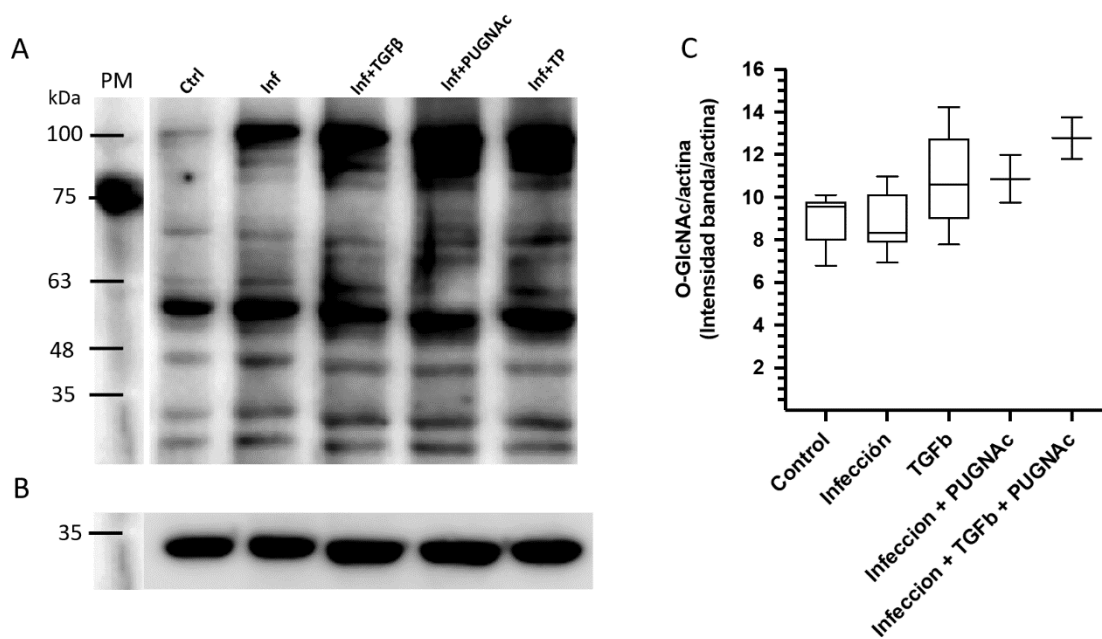


Figura 33. Efecto de Inhibidor PUGNAc y TGF- β sobre las O-GlcNAcización ante infección por VIA. A. Se incubó WB anticuerpo para O-GlcNAc, donde se observaron las bandas de aquellas proteínas que están siendo O-GlcNAcizadas en las diferentes condiciones ya mencionadas. B. El WB fue incubado con β -actina para control de carga de la proteína. C. Grafica representativa del análisis de los datos obtenidos. A. Análisis de WB de los lisados celulares para los tratamientos Control, Infección con VIA y pretratamiento con TGF- β e infección. Las bandas inmunorreactivas observadas para el anticuerpo RL2 fueron reveladas por quimioluminiscencia. B. El WB para β -actina de los lisados celulares se emplearon como control de carga de proteína de cada experimento. Para la comparación entre condiciones, se determinó las intensidades de píxeles/mm² del carril de cada experimento y se ajustó en base la intensidad relativa de la banda de β -actina. C. Análisis estadístico de resultados de densitometría. Resultados corresponden a 6 experimentos independientes. kDa, kiloDaltones; PM, pesos moleculares de los estándares; Ctrl, Control; Inf, infección; Inf+TGF β , Infección más tratamiento TGF- β ; Inf+TP; Infección más tratamiento de TGF- β más inhibidor PUGNAc (inhibidor de OGA).

Por su parte, en la Figura 33C, se muestran los resultados ajustados para la intensidad de las bandas de β -actina y se compilaron los resultados de los 2 experimentos independientes que se pudieron realizar. Sin embargo, debido al poco número de repeticiones

no fue posible evaluar los resultados por métodos estadísticos. Como se observó previamente, a pesar de que la Figura 33A muestra un claro incremento de la O-GlcNAcilación como consecuencia de la Infección sola o en conjunto con el tratamiento de TGF- β . Los resultados de otros experimentos fueron menos claros; de manera tal que estadísticamente no pudimos alcanzar una diferencia significativa en comparación a las condiciones control. Por otra parte, el nivel promedio de intensidad de bandas para la condición de Infección + PUGNAc fue de 10.87 ± 1.56 UA, mientras que la condición de Infección + TGF- β + PUGNAc fue de 12.78 ± 1.39 UA. Aunque los niveles de intensidad de las bandas fueron superior a los resultados obtenidos para la infección sola o en combinación con tratamiento de TGF- β , no se pudo hacer un análisis estadístico. Asimismo, nos interesa hacer hincapié que otra vez, el pre-tratamiento con TGF- β parece inducir un efecto aditivo positivo sobre el nivel de estimulación inducido por el inhibidor de OGA.

En su conjunto, observamos que los niveles de M1 de las células infectadas se modifican por efecto del pre-tratamiento con TGF- β y el uso de inhibidores de OGT u OGA. Por su parte, mientras los inhibidores mostraron el efecto esperado para la O-GlcNAcilación durante la infección de la línea celular, sin embargo, el efecto del inhibidor de OGA (PUGNAc) se modificó por efecto del TGF- β . Mientras que esto no sucedió con el inhibidor para OGT (OSMI-1). Todo esto, nos sugiere que la infección viral responde de manera compleja al pre-tratamiento con TGF- β y la inhibición de las enzimas encargadas de la O-GlcNAcilación, sugiriendo que estos elementos juegan un papel activo durante la infección, sin embargo, se requiere más experimentos para poder conocer los mecanismos biológicos por lo cual modifican la infección viral.

8. DISCUSIÓN:

8.1. Efecto del TGF- β sobre la infección viral

TGF- β es una citocina pleiotrópica, con importantes funciones sobre diferentes tipos celulares durante el desarrollo embrionario, como los cartílagos, el hueso y la piel, jugando un papel importante en el crecimiento y diferenciación de estos tejidos. Asimismo, estimula la quimiotaxis de monocitos, linfocitos, neutrófilos, migración de fibroblastos, y juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica, tolerancia, la reparación tisular y el desarrollo de fibrosis (Larson, 2020; Travis, 2014). Las alteraciones en la señalización de TGF- β son la base, por ejemplo, de muchas enfermedades inflamatorias y en el desarrollo de tumores y cáncer, ya que las alteraciones desde los niveles en la expresión y activación de los receptores y de las vías de señalización dependientes de esta citocina, pueden desencadenar patologías crónicas. Algunos autores han denominado este efecto como el “lado oscuro del TGF- β ”, ya que algunos estudios revelaron que esta citocina tiene un papel funcional en la evasión inmunitaria tumoral (Aluwihare, 2008). Así como TGF- β interviene en la homeostasis de la respuesta inmune a diferentes niveles, también participa en la respuesta frente a las infecciones por microorganismos. Una gran cantidad de evidencias sugieren que TGF- β controla la interacción entre el patógeno y su hospedero, modulando las diferentes fases de la patogénesis y jugando un papel importante en la respuesta inflamatoria y la resolución a la infección, así como en la reparación de tejidos (Saito, 2018).

En el contexto de infección por virus, TGF- β puede proteger de la patología asociada a infecciones agudas. Sin embargo, en infecciones crónicas tiene un efecto perjudicial sobre la inmunidad mediada por células T. Por ejemplo, en la infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica crónica (LMCV), la presencia de TGF- β y la activación por fosforilación de Smad-2 mostraron ser un punto clave de la respuesta de las células T CD8⁺ durante las infecciones virales crónicas *in vivo* (Tinoco, 2009). Esta evidencia mostró que los linfocitos T CD8⁺ de ratones infectados con dos cepas distintas de LMCV presentaron una mayor fosforilación de la proteína Smad-2 y la presencia de la proteína pro-apoptótica Bim, sugiriendo una respuesta reducida por linfocitos T CD8⁺ en infecciones crónicas. Además, ratones T β RIIdn no mostraron la presencia de la proteína Bim bajo las mismas condiciones

de estudio de infección por LMCV (Tinoco, 2009). Es importante señalar, que, en este contexto, TGF- β parece ser una citocina insuficiente para la eliminación del virus.

Algunas proteínas de virus inducen la producción y secreción de TGF- β , como ocurre con la proteína no estructural NS4 del virus de hepatitis C (HVC) (Rowan, 2008). En este contexto, se observó un aumento en la secreción de IL-17, IFN- γ , IL-10 y TGF- β , lo que sugiere que la infección por HCV induce respuesta de evasión de la respuesta inmune al inhibir las respuestas tipo Th1 y Th17. Esta información se correlaciona con estudios en pacientes infectados con el virus de hepatitis B o C, donde los niveles de TGF- β están incrementados con respecto a individuos sanos, lo cual contribuye, adicionalmente, en el desarrollo de fibrosis hepática (Marek, 2002; Yao, 2021). Además, pacientes que presentan polimorfismos en el gen *tgfb* presentan una mayor cantidad de TGF- β en plasma, lo que se ha relacionado con un peor desenlace frente a infecciones por hepatitis C (Dai, 2008).

En la infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana) el desarrollo de la enfermedad se puede correlacionar con los niveles de TGF- β (Wiercinska-Drapalo, 2004). Se sabe que esta citocina induce la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en macrófagos, favoreciendo el tropismo del virus hacia este tipo celular y los linfocitos T CD4⁺ (Chen, 2005). Sin embargo, la infección por VIH de linfocitos Treg inhibe la expresión de Foxp3 y la secreción de TGF- β , incrementando la producción de IL-4, lo que pudiera explicar por qué algunos pacientes con VIH presentan inflamación crónica en diversos tejidos (Pion, 2020).

En su conjunto, esta información sugiere que algunos virus han seleccionado mecanismos que alteran la expresión, producción, secreción y activación de TGF- β , regulando así tanto la respuesta celular como la respuesta inmunológica (Lodyga, 2020). Por todo esto consideramos que es importante identificar cuáles son los mecanismos celulares bajo los cuales pudieran llevar a cabo este control.

Varios estudios muestran que el momento de liberación y activación de TGF- β así como el tipo celular que lo produce, parece ser fundamental en el desenlace de la enfermedad causada por influenza (Schultz-Cherry, 1996; Roberson, 2012). Dado que durante la infección natural por VIA, las células epiteliales son las primeras células en ser infectadas, por ello, en nuestro modelo *in vitro*, con las células A549, se evaluó el efecto directo de TGF- β sobre las consecuencias de la infección por VIA. Anteriormente, Denney y cols., mostraron

la importancia del tiempo de aparición de TGF- β y de INF- β producido por células epiteliales en ratones infectados con la cepa de VIA H3N2, indicando que estas citocinas determinan el curso y el desenlace de la enfermedad causada por el virus. De esa manera, la secreción y activación de TGF- β en ese trabajo, ocurrió a 12 hpi, mientras que la presencia de IFN- β después de 48 hpi. Empleando ese sistema, los ratones deficientes para TGF- β mostraron un incremento de IFN- β a las 24 hpi, sugiriendo que TGF- β induce cambio en la temporalidad de la respuesta celular epitelial frente a la infección por VIA (Denney., et al. 2018). Por su parte, en el modelo *in vitro* propuesto por BustosRivera y colaboradores, mostró que el pre-tratamiento con TGF- β 1 indujo un retraso y una reducción en la abundancia relativa de la proteína M1 con respecto a las células que sólo fueron infectadas. Adicionalmente, estos resultados fueron corroborados al evaluar las partículas víricas infectivas mediante ensayos de unidades formadoras de foco (uff/ml) de sobrenadantes de células A549 (BustosRivera-Bahena, 2021). Por otro lado, el papel benéfico de la presencia de TGF- β fue observado en un modelo murino con asma. En estas condiciones ratones asmáticos por OVA mostraron resistencia a la infección por H1N1 VIA. Al evaluar los tejidos pulmonares se observó un fuerte incremento en los niveles de TGF- β , exhibiendo una reducción tanto de citocinas inflamatorias, así como de proteínas totales y citotoxicidad en las vías respiratorias, indicadores de una disminución de la lesión tisular. De esa manera, los autores sugirieron que el efecto no dependió del ciclo de replicación del virus, sino del perfil inflamatorio de los animales, ya que un aumento transitorio en la expresión de TGF- β 1 después del asma aguda puede inducir protección contra la inmunopatología inducida por influenza (Furuya, 2015). Adicionalmente, en el mismo estudio, empleando un ratón knockout condicionado para el receptor T β R2, se observó que la pérdida funcional de este receptor impactó en la resistencia a la infección por IAV (Furuya, 2015).

En este contexto, los resultados del presente estudio merecen cierta discusión. Como se pudo observar, en las condiciones estandarizadas, el pre-tratamiento con TGF indujo un incremento significativo en los niveles de la proteína viral M1, en comparación a las condiciones de la infección viral (Figura 23). Asimismo, la incubación con TGF- β previo a la infección indujo un ligero incremento en el perfil de O-GlcNAcilación de proteínas de células A549, pero sin alcanzar una diferencia significativa. Este último resultado posiblemente fue resultado de la importante variación observada entre los experimentos.

Como se describe en Material y Métodos, esto hizo necesario normalizar los resultados en base a los niveles observados por las células infectadas. Tomados en su conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que TGF- β favorece la infección viral, evento que parece coincidir con el incremento de la O-GlcNAcilación de proteínas. Con respecto al primer punto, nuestros resultados parecen ser congruentes con los resultados de Denney y cols. donde el incremento de TGF- β favorece la infección viral (Denney, 2018). Al mismo tiempo, como se describió antes (Schultz-Cherry, 1996; Roberson, 2012), otros estudios previos observaron que la infección viral ocasionó un incremento de esta citocina, así como la activación de la forma latente del TGF- β , entre otras por la acción de la neuraminidasa viral (Carlson, 2010). Esto parece hacer congruente considerar que la presencia de TGF- β podría incidir positivamente en el ciclo replicativo del virus.

Sin embargo, como también se describió en la sección de Antecedentes, experimentos previos de nuestro grupo de investigación, empleando este mismo modelo de estudio, nos mostró resultados diferentes. Mientras que en el estudio de BustosRivera y colaboradores se observó que el pre-tratamiento con TGF- β inhibió significativamente la apoptosis, la infección viral y la estimulación de la vía de IL-1 β (BustosRivera-Bahena, 2021), nuestros actuales experimentos muestran un efecto estimulador de la infección viral. En búsqueda de una explicación de estos resultados tan diferentes hay que manifestar que debido a problemas técnicos no se pudo contar con un lote de virus viral suficiente para el total de los experimentos, por lo que se emplearon alícuotas de líquido alantoideo infectados con virus H1N1, por lo que no se pudo garantizar el mismo nivel de infección para todos los experimentos. En ese sentido, sería posible considerar que la variación experimental observada fue consecuencia de alteraciones en estos lotes de virus.

Por otro lado, como se describe la línea celular A549 fue mantenida en condiciones estándar empleando medio Advanced DMEM F12, el cual muestra una formulación significativamente diferente con respecto al medio de cultivo DMEM empleado en la publicación. Particularmente es importante destacar que el medio de cultivo empleado en este estudio contiene una mayor concentración de glucosa (3,151 vs 1,000 mg/L de glucosa) y está suplementado con albúmina (Albumax), transferrina e insulina.

En estas circunstancias, se podría suponer que el "status" metabólico de las células A549 podría ser superior al evaluado en la publicación previa (BustosRivera-Bahena, 2021)

y quizás esto indujo un cambio significativo en el efecto biológico de la co-estimulación con TGF- β . Como se discutirá más adelante, los resultados de este estudio sugieren que, a pesar de eso, parte de los resultados sugieren que el TGF- β puede no sólo tener un efecto activo durante la infección por VIA, sino co-participar con los eventos de O-GlcNAcilación.

8.2. Efecto de la O-GlcNAcilación sobre la infección viral

La O-GlcNAcilación es un proceso enzimático de alta importancia, donde se agrega N-acetilglucosamina (GlcNAc) a los residuos de Ser y Thr de las proteínas citoplasmáticas y nucleares. Este procedimiento se lleva a cabo por la enzima O-GlcNAc transferasa (OGT), la cual se encargará de agregar la GlcNAc, mientras que la O-GlcNAcase (OGA) es la enzima encargada de retirar la GlcNAc (Zachara, 2002). Actualmente se cuenta con evidencias de que este proceso está implicado en funciones tan diferentes en la célula como regulación de la expresión génica, el correcto plegamiento de las proteínas y la activación del sistema inmune (Lefebvre., et al. 2015). Sin embargo, por otro lado, su alteración puede favorecer el desarrollo de diferentes enfermedades como la diabetes mellitus, cáncer, así como trastornos congénitos, entre otras (Martinez-Duncker, 2008; Chiaradonna, 2018). Del mismo modo, este proceso participa en el organismo para diversas funciones y estudios recientes sugieren que también juega un rol importante durante las infecciones virales, actuando de muy diferente manera en cada tipo de virus. Por ejemplo, en el caso de la infección por VIH, donde la expresión del gen y la replicación están siendo regulados por la unión de factores de transcripción a los sitios de regulación específicos en el promotor/potenciador. En ese sentido, se ha demostrado que la O-GlcNAcilación de Sp1 por la enzima OGT en diferentes líneas celulares de linfocitos T y células CD4 primarias inhibe su activación y, por lo tanto, la actividad del promotor LTR del VIH (Jochmann, 2009). Un caso diferente es el virus herpes simplex, donde la O-GlcNAcilación del factor celular del hospedero 1 (HCF-1) favorece la replicación del virus. De esa manera, al inhibir la enzima OGT por el inhibidor OSMI-1 se afecta la expresión temprana de genes de HSV y la replicación viral (Angelova, 2015).

Por su parte, para la infección del virus Influenza, a nuestro conocimiento, se han publicado dos estudios recientes, sin embargo, los resultados parecen ser diferentes. En uno de estos estudios (Wang, 2019), confirmaron que la activación de la vía biosintética de hexosaminas por GlcN favorece la infección por VIA, al tiempo que se estimula la "tormenta" de citocinas. En dicho estudio, se encontró que la infección por VIA coincide con la O-GlcNAcilación del factor regulador de interferón 5 (IRF5), lo cual lleva a su poliubiquitinación y su posterior degradación por proteasoma. En ese contexto, la O-GlcNAcilación de IRF5 inhibe la activación de la respuesta de interferones de tipo I, por lo cual se sugiere, permite la producción de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, el otro estudio (Song, 2019), fue realizado con células tipo inmune, se sugiere que la enzima OGT lleva a cabo la O-GlcNAcilación de la molécula MAVS presente en mitocondria y parece ser un evento esencial para la respuesta antiviral por interferones de tipo I. En ese sentido, parece que la O-GlcNAcilación es un factor inhibidor la infección viral. Independientemente del tipo de célula evaluada, ambos grupos evalúan el efecto de la administración de GlcN en un modelo murino de infección y obtienen resultados contradictorios: mientras que el grupo de Wang y colaboradores suministraron a ratones una dieta con 50 mg/kg de glucosamina por inyección intraperitoneal durante una semana y, posteriormente, estos fueron infectados por virus Influenza A H1N1 cepa WSN 33. Como resultado, observaron que los ratones suplementados con GlcN tenían una mayor mortandad en comparación a aquellos que no habían sido sometidos a la dieta con GlcN (Wang, 2019). Por su parte, Song y colaboradores suplementaron a los ratones con GlcN (25 gr/kg), lo cual resultó en mayor sobrevivencia a la infección por VIA (A/WSN/1933 y A/California/07/2009), al tiempo que estos ratones generaron niveles más elevados de interferones (Song, 2019). Ante este contexto, resulta difícil poder generalizar.

Inicialmente, en los experimentos realizados como parte de la tesis de licenciatura (Núñez-Rueda, 2018), observamos que la infección viral coincide con un incremento de los niveles de proteínas O-GlcNAcizadas, evaluada por WB. Asimismo, confirmamos que la incubación del cultivo celular incubado con el inhibidor de OGT pareciera disminuir la presencia de M1. En el presente estudio, de acuerdo con las condiciones estandarizadas, el pretratamiento con GlcN indujo un incremento en la presencia de la proteína viral M1 en comparación con la infección sin ningún tratamiento (Figura 26), lo que sugiere que esto

favorece al proceso de infección viral; resultado muy similar a lo reportado por el grupo de Wang (Wang, 2019). Por su parte, al emplear cualquiera de los inhibidores tanto para OGT como de la OGA, observamos resultados que parecen favorecer la infección viral. Cuando se inhibió la enzima OGT con el inhibidor OSMI-I, se observó un incremento en la presencia de la proteína M1 (Figura 29), lo que sugirió que también al inhibir la O-GlcNAcilación la infección por VIA es favorecida, lo mismo sucedió al inhibir la OGA con el inhibidor PUGNAc (Figura 31). Al mismo tiempo se comparó el efecto de ambos inhibidores sobre la infección por VIA esto, para ver si no había una diferencia en el incremento de la proteína viral y los resultados fueron no significativos, lo que sugirió que tanto al inhibir la OGT o la OGA la expresión de la proteína viral M1 se mantiene en el mismo nivel (Figura 32), sugiriendo que cualquier alteración en los niveles de O-GlcNAcilación parece favorecer la infección viral. A ese respecto, nuestros resultados con la inhibición de OGA fueron similares a lo reportado por Wang y colaboradores (Wang, 2019); pero, por el contrario, la inhibición de OGT por OSMI-1, en ese estudio coincidió con la inhibición de la infección, mientras que nosotros observamos un incremento de los niveles de la proteína viral M1.

Por su parte, en el estudio de Song y cols., el uso de OSMI-1 (inhibidor de OGT) bloqueó la activación de IRF3 y la O-GlcNAcilación de proteínas, pero no llevó a inhibir la respuesta antiviral inducida por GlcN (ruta de biosíntesis de glucosaminas). Estos resultados sugieren que la O-GlcNAcilación de proteínas no tiene forzosamente que ir de acuerdo con la infección viral. En ese sentido, los resultados de las Figuras 29 a la 31 parecen ir de acuerdo con las observaciones de Song y cols. Inicialmente, el pretratamiento con GlcN no pareció inducir cambio en el nivel de O-GlcNAcilación de proteínas, en comparación con las células infectadas sin tratamiento alguno (Figura 28). Asimismo, con el empleo del inhibidor de OGT (OSMI-I) logramos observar una disminución significativa de la O-GlcNAcilación de las proteínas, en comparación con la infección (Figura 30), lo que sugiere que el inhibidor de OGT si funciona; sin embargo, esto parece no bloquear la infección (Figura 29).

Por el contrario, con el empleo del inhibidor de OGA (PUGNAc), logramos observar un incremento en la O-GlcNAcilación de las proteínas, lo que sugiere una acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas, comparándolo con la condición de infección sin tratamiento alguno (Figura 33). Por su parte, esto parece tener un efecto sobre la replicación viral del virus de Influenza, lo cual se muestra en la Figura 32, donde se observa un incremento de la

presencia de proteína viral M1. Entonces al comparar nuestros resultados, podemos sugerir que tanto la inhibición como la estimulación de la O-GlcNAcilación de las proteínas, parecen promover la infección por VIA; a diferencia de los dos estudios referidos donde la inhibición de la O-GlcNAcilación parecía inhibir la infección viral (Wang, 2019), mientras que el otro estudio mostró que no estaba directamente asociado con el resultado de la infección (Song, 2019).

Con respecto al tratamiento con GlcN, podremos decir que nuestros resultados parecen coincidir con las observaciones obtenidas de Wang y cols. Por su parte, al revisar los resultados obtenidos por el empleo del inhibidor de OGT, nuestros resultados parecen coincidir con lo obtenido de Song y cols., mientras que el efecto del inhibidor de OGA parece coincidir con los resultados de Wang, más que con los de Song.

Como se describió antes, por problemas técnicos, tuvimos que finalizar los experimentos con el empleo de líquido alantoideo infectado por virus de influenza A H1N1, lo cual potencialmente pudo haber alterado parcialmente los resultados, fundamentalmente de los niveles de O-GlcNAcilación. También cabe mencionar que se utilizaron cepas virales diferentes, entre el presente estudio y los trabajos de Wang y Song (Wang, 2019; (Song, 2019)). Mientras que ellos emplearon la cepa de Influenza A H1N1 WSN 33, nosotros utilizamos Influenza A H1N1 New Caledonia 99. Del mismo modo, también nosotros evaluamos los resultados obtenidos después de 48 hrs post-infección, mientras que ellos lo vieron a menor tiempo (3-24 hrs). Por esto mismo, es razonable considerar que, debido a la variación de materiales, métodos y técnicas empleadas, los resultados obtenidos pudieran ser diferentes. Cabe mencionar que sería importante emplear estas condiciones en modelos *in vivo*, para observar si la modificación de la O-GlcNAcilación tiene un efecto favorecedor para el virus o para el hospedero. Pero como vimos para el caso de estas dos publicaciones recientes, la evaluación *in vivo* generó resultados contradictorios.

Independientemente de que la O-GlcNAcilación pueda tener un papel inhibidor o estimulador de la infección viral, en base a los resultados de la literatura y los que se presentan en este estudio, parecen sugerir que la adición de GlcN juega un papel activo en la infección por el VIA, a pesar de que se desconoce cabalmente como este mecanismo actúa en la infección.

Tabla IV. Comparación entre los procesos de infección de 3 diferentes autores.

AUTOR	Núñez-Rueda, et al. 2022	Wang, et al. 2019	Song, et al. 2019
Células/Modelos de estudio	A549	PBMCs, A549, 283T, RATONES	BMDMs, HEK293T, HeLa, Vero, RATONES
Cepas virales	VIA, H1N1, New Caledonia 99 (MOI 4) Líquido Alantoideo infectado con Influenza A H1N1 (100 ml)	VIA, H1N1, WSN/33 (MOI 1) VIA, H1N1, FM/1/47	VIA H1N1, WSN/1933 (MOI 1) VIA, California/07/2009 (MOI 1) VIA resistente a Oseltamivir.
Tiempo de infección	48 hrs	0, 6, 12, 24 Y 48 hrs	0, 3, 6, 12 Y 24 hrs
Tx GlcN	10 mM	5, 10 y 20 mM	5, 10, 20 y 40 mM
Tx OSMI-I (Inh. OGT)	50 μ M	20 μ M	25, 40 μ M
Tx PUGNAc (Inh. OGA)	50 μ M	50 μ M	--
Resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Efecto de GlcN: Incremento en la presencia de proteína viral M1 y proteínas O-GlcNAcizadas. - Efecto de OSMI-I: Incremento de la proteína viral M1 y disminución en la O-GlcNAcización de las proteínas. - Efecto de PUGNAc: Incremento de la presencia de proteína M1 y un incremento de las proteínas O-GlcNAcizadas. - Conclusión: Tanto la O-GlcNAcización como su inhibición favorece la infección por VIA. 	<ul style="list-style-type: none"> - GlcN: Incremento de título viral, proteína viral M1 y mortalidad en animales. - OSMI-I: Disminución en la proteína viral M1 y título viral y disminución de proteínas proinflamatorias. - PUGNAc: Incremento en la proteína viral M1, título viral e incremento de proteínas proinflamatorias. - Conclusión: A mayor O-GlcNAcización, mayor replicación viral y producción de citocinas proinflamatorias. 	<ul style="list-style-type: none"> - GlcN: Disminución en el título viral, pero incremento en proteínas O-GlcNAcizadas. - OSMI-I: Disminución en la O-GlcNAcización de las proteínas y al bloquear OGT mediante células cKO. También incremento en el título viral y de mRNA de M1. - PUGNAc: Incremento en la O-GlcNAcización de proteínas. - Conclusión: A mayor O-GlcNAcización hay mayor expresión de interferones e inhibición de la replicación viral.

8.3. Relación entre TGF- β y O-GlcNAcilación

TGF- β y los eventos de O-GlcNAcilación juegan una parte fundamental en varios procesos celulares, las cuales incluyen las infecciones por los virus. Sin embargo, como también se describió antes, aún es breve la literatura al respecto y, por lo tanto, se desconoce cómo es que estos eventos podrían participar en el desarrollo de las infecciones virales.

En ese mismo sentido, otro aspecto de gran interés sería confirmar que el TGF- β tiene un efecto en el curso de la O-GlcNAcilación. En ese contexto, un estudio previo mostró que la O-GlcNAcilación juega un papel importante en la señalización de TGF- β al modificar proteínas SMAD. De esta manera, se identificó que uno de los objetivos de la modificación por O-GlcNAc fue la SMAD4, la cual permite que las SMAD fosforiladas puedan viajar al núcleo de la célula y realizar sus funciones de transactivación génicas. En este estudio, se demostró que los niveles de las proteínas SMAD4 cambian de acuerdo con los niveles de O-GlcNAc en células cancerígenas de pulmón humano (A549): la O-GlcNAcilación en la Thr63 de Smad4 impide su interacción con GSK-3B, el cual es un promotor proteosomal de degradación de SMAD4 y lo cual resulta en un incremento de su vida media (Yeon., et al. 2020). Sin embargo, se desconoce cómo es que este efecto podría beneficiar o no a las infecciones virales, y no podemos dar un ejemplo de estos tres aspectos, la O-GlcNAcilación, TGF- β y virus, ya que no existe datos bibliográficos en conjunto al respecto.

En ese contexto, merece la pena discutir lo que nosotros encontramos en el presente estudio, respecto a estos aspectos antes mencionados. Inicialmente, quisimos evaluar cuál era el efecto de TGF- β sobre la actividad estimulante de la GlcN. Como se observa en la Figura 27, la incubación individual del TGF- β o de GlcN incrementaron los niveles de M1. Sin embargo, la incubación conjunta de TGF- β y GlcN no indujo un cambio significativo en comparación a cualquiera de los dos estímulos independientes. Esto puede sugerir que la estimulación de la vía de biosíntesis de las hexosaminas y la señalización por TGF- β son eventos independientes y pueden adicionar su efecto en la célula. En ese sentido, sería de gran interés evaluar en un modelo celular similar al aquí propuesto, si la cascada de señalización del TGF- β se activa por la presencia de la citocina o que la presencia de GlcN no interfiere en su función. Como se describió arriba, un estudio previo sugiere que la estimulación de la O-GlcNAcilación en células A549 debería favorecer la vida media de

SMAD4 y, por lo tanto, uno esperaría un efecto mayor de la citocina reguladora. Sin embargo, esto no fue posible observarlo en los resultados actuales.

Por otro lado, al evaluar el efecto de la incubación conjunta de TGF- β y GlcN sobre la O-GlcNAcilación de proteínas, observamos que, a diferencia de los estímulos aislados, la suma de los reactivos significó un incremento de los niveles de intensidad de bandas O-GlcNAcizadas (Figura 28). Por un lado, esto parece confirmar la O-GlcNAcilación de proteínas va de acuerdo con un incremento de infección viral, como se discutió en la sección mencionada previamente. Asimismo, en base a la misma Figura 28, la presencia del TGF- β parece tener un papel clave para estimular la O-GlcNAcilación de proteínas, mucho más que la sola incubación con GlcN. Esta observación parece ser diferente a los estudios previos, donde la GlcN parece ser por excelencia un estimulador potente de la O-GlcNAcilación. Para tratar de explicar esto, hay que recordar que nuestros ensayos fueron realizados en presencia de concentraciones mayores de glucosa, por lo que la estimulación de la vía de biosíntesis de hexosaminas por efecto de la GlcN podría tener un efecto marginal. En esas circunstancias, el observar que la adición de TGF- β estimuló la modificación de las proteínas a un nivel mayor que la GlcN podría significar que su efecto estimulador resulta por un mecanismo diferente a la ruta de las hexosaminas. En ese sentido, la evaluación de los intermediarios de la vía de señalización por TGF- β podría aportar información sobre el mecanismo de estimulación de la O-GlcNAcilación.

Por su parte, al evaluar el efecto conjunto de la inhibición de OGT y TGF- β observamos un incremento de los niveles de la proteína M1, como se muestra en la Figura 29, por encima de los efectos individuales, sugiriendo un efecto aditivo de ambos tratamientos. Al analizar sí este mismo tratamiento tenía algún efecto sobre la O-GlcNAcilación en las proteínas (Figura 30), observamos que tuvo una disminución de la O-GlcNAcilación relativa, en comparación con la infección o con el tratamiento solo por TGF- β . Aunque este efecto visualmente no fue tan claro, hay que considerar que el análisis de densitometría ajusta los valores acumulados de las bandas, en base a la intensidad de las bandas correspondientes para b-actina. Como se puede ver, las bandas de b-actina fueron mayores para las condiciones de infección sola y las dos con el inhibidor OSMI-1. Un resultado similar fue obtenido una segunda vez, con una variación experimental discreta. A pesar de no haber realizado un tercer experimento independiente, nos permite sugerir que

nuestras observaciones son congruentes. En base a estos resultados, por un lado, nos sugiere que el TGF- β y la inhibición de OGT estimulan la infección viral, sin embargo, el efecto estimulador que potencialmente pudiera tener TGF- β sobre la O-GlcNAcilación (efecto sobre GlcN) no fue capaz de superar el efecto inhibitor de OSMI-1.

Por el otro lado, el empleo del inhibidor de OGA en conjunto con TGF- β mostró un claro efecto estimulador de la infección viral (Figura 31), superior al efecto de los tratamientos individuales. Sin embargo, hay que considerar que se observó un alto nivel de variación experimental posiblemente provocado por las limitaciones técnicas del lote viral. Asimismo, la adición conjunta del inhibidor de OGA y TGF- β indujo un incremento de la O-GlcNAcilación de las proteínas (Figura 32), en un nivel mayor en comparación de los tratamientos por sí solos, lo que sugiere que el efecto de cada reactivo potencialmente favorece la O-GlcNAcilación de proteínas actuando sobre vías alternas o complementarias; a diferencia del efecto del inhibidor de OGT, donde el efecto de TGF- β desaparece al emplear el reactivo OSMI-1.

Los resultados sugieren que el TGF- β parece estimular la O-GlcNAcilación por un mecanismo dependiente de OGT, pero independiente a la vía de biosíntesis de hexosaminas, por lo que muestra un efecto aditivo cuando las células son infectadas por VIA o tratadas con GlcN o el inhibidor de OGA. Sin embargo, es aún incierto como esta citocina puede estimular la función de OGT. En base a nuestro estudio previo (BustosRivera-Bahena., et al. 2021), se sugirió que los niveles de Smad7 podría incrementarse en respuesta a la infección por VIA, por lo que sería interesante poder evaluar si este efecto no induce un efecto sobre la función de la OGT. Por otro lado, Wang y colaboradores propusieron que la infección por VIA estimulaba la OGT y modificaba la proteína IRF5 para favorecer su degradación vía proteasoma. En el mismo estudio, indicaron que otras proteínas fueron blanco de esta OGT inducida por la infección viral, de las cuales destacamos a la proteína TAK-1, que es un intermediario de la vía de señalización alternativa del TGF- β y elemento muy activo para la promoción de la expresión génica. En este sentido, también sería interesante poder evaluar si el efecto conjunto de infección por VIA y TGF- β coinciden en la activación de TAK-1 y su efecto estimulador de la O-GlcNAcilación de proteínas. En resumen, los actuales resultados parecen sugerir que TGF- β y la O-GlcNAcilación juegan un papel activo durante la infección por VIA, a pesar de que se desconoce el mecanismo como es que esto interactúan, lo cual

sería importante continuar estudiando con el fin de poder identificar nuevos y potenciales blancos terapéuticos para la infección por VIA.

8.4. Limitaciones

El presente estudio presentó varias limitaciones técnicas y de diseño. Lamentablemente, la elaboración de los experimentos coincidió con períodos más críticos de la pandemia provocada por SARS- Cov-2 por lo que los experimentos tuvieron que modificarse y suspenderse por varios meses. Asimismo, la evaluación de O-GlcNAcilación fue realizado durante los últimos meses, debido a la falta de equipo para el revelado de WB. Todo eso limitó que se pudieran dar respuesta a algunas de las preguntas antes planteadas.

Como se indicó antes, debido a las limitaciones técnicas, no nos fue posible generar nuevos lotes de virus H1N1, razón por la cual empleamos alícuotas de líquido alantoideo infectado para llevar a cabo los últimos experimentos. Sin embargo, a pesar de confirmar que nos permitió generar la expresión de M1, no es seguro que el nivel de infección pueda ser similar a los primeros experimentos. En ese sentido, nos fue de gran apoyo el observar que los inhibidores de OGT y OGA mostraron efectos previamente descritos en la literatura.

Asimismo, como se describió también antes, el realizar los experimentos en células mantenidas en concentraciones elevadas de glucosa podría ser un elemento importante para explicar los efectos discretos de la GlcN y los efectos estimuladores del TGF- β . En ese sentido, uno de los primeros experimentos que se quisiera probar con un nuevo lote de virus es evaluar el efecto de la concentración de glucosa sobre la respuesta a la infección viral. En ese contexto, el evaluar los niveles de expresión de las enzimas OGT y OGA podrían ser de ayuda para generar un cuadro integral del papel de la O-GlcNAcilación en el curso de la infección viral.

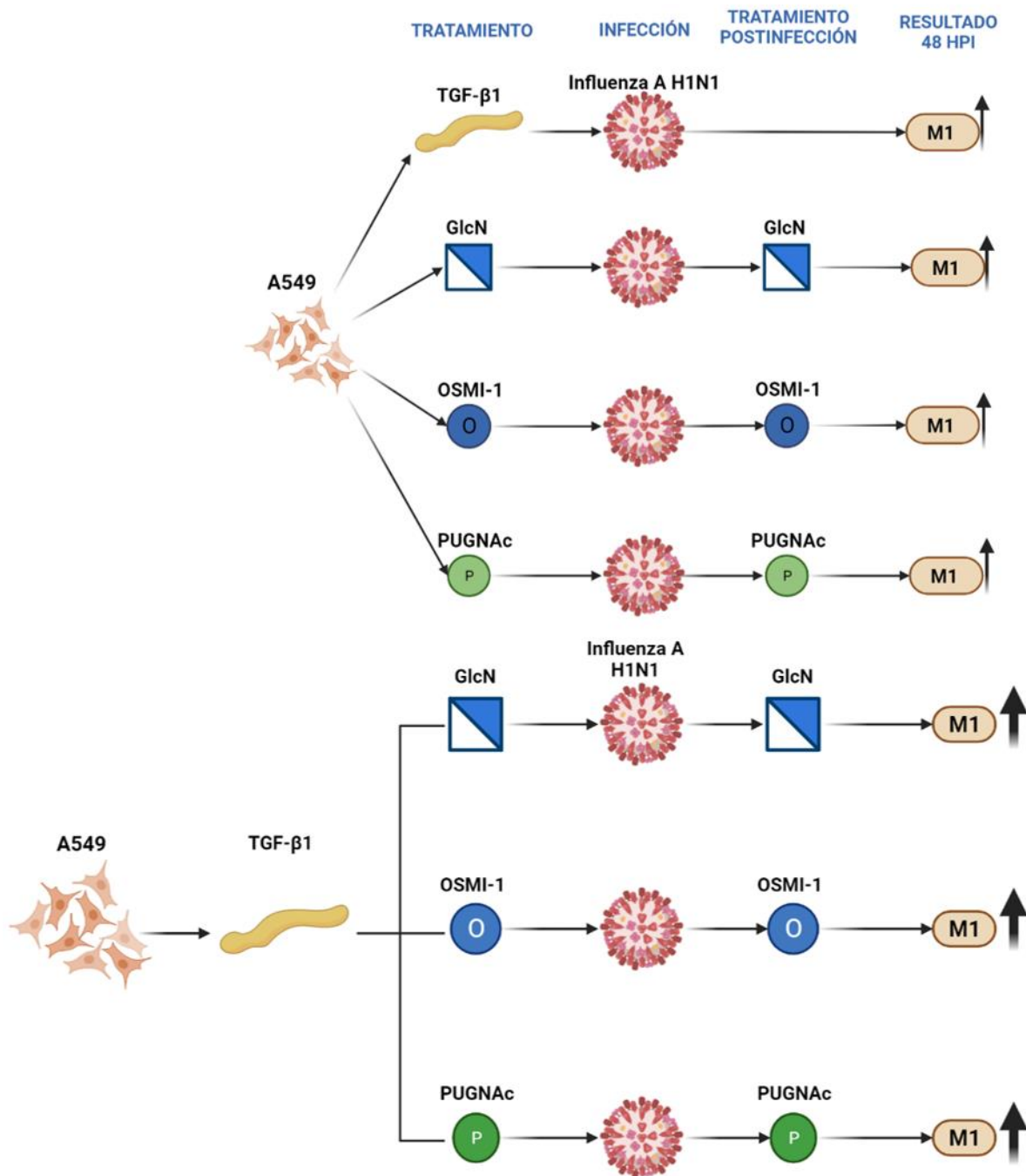


Figura 34. Esquema de la conclusión del trabajo de maestría. Se muestra en la sección de arriba se muestran las células A549 las cuales fueron sometidas a diferentes tratamientos como: TGF- β 1, Glucosamina (GlcN), Inhibidor de OGT (OSMI-1) e inhibidor de OGA (PUGNAc), posteriormente se infectaron con virus de Influenza A H1N1 cepa New Caledonia 99 durante una hora, y seguido de ello se agregaron nuevamente los tratamientos de GlcN, OSMI-1 y PUGNAc, al transcurrir 48 hpi, se recolectaron los sobrenadantes y observamos que hubo un incremento (\uparrow) en la expresión de la proteína viral M1. Asimismo, se sometieron los tratamientos para la O-GlcNAcilación sobre el efecto de TGF- β 1 en la infección por VIA, y al agregar GlcN, OSMI-1 y PUGNAc previo a la infección, junto con TGF- β 1 y después de la infección, pero sin TGF- β 1, se logro observar un mayor incremento ($\uparrow\uparrow$) en la expresión de la proteína viral M1.

9. CONCLUSIONES

1. Se confirmó la infección por el virus de Influenza A H1N1 (New Caledonia 99) en la línea celular A549, bajo las condiciones establecidas.
2. La presencia de 10 mM de GlcN incrementó de manera significativa los niveles de M1 por el virus Influenza H1N1 en células A549.
3. El tratamiento con TGF- β 1 sobre la infección por VIA, incrementó la expresión de M1, lo que sugiere que el tratamiento favorece la infección viral.
4. Los tratamientos individuales con los inhibidores de OGT (OSMI-I) u OGA (PUGNAc) incrementaron los niveles de expresión de la proteína M1, sugiriendo que cualquiera de estos tratamientos favorece infección viral.
5. Al combinar los tratamientos de TGF- β con GlcN, OSMI-I y PUGNAc se observó un incremento de la expresión de la proteína M1 en comparación con los tratamientos por si solos, lo que sugirió que el TGF- β juega un papel estimulador adicional sobre el efecto de la O-GlcNAcilación.
6. Al evaluar los niveles de O-GlcNAcilación mediante Western Blot en las diferentes condiciones y tratamientos, se observó que la infección viral no altera la O-GlcNAcilación de las proteínas a las 48 horas.
7. Por su parte, la inhibición de OGT (OSMI-I) provocó una disminución de la O-GlcNAcilación de proteínas. Mientras que la inhibición de OGA (PUGNAc) indujo un incremento de este tipo de glicosilación de proteínas, durante el curso de la infección por 48 horas.
8. Por otra parte, el tratamiento con TGF- β indujo un incremento en la O-GlcNAcilación de las proteínas en comparación con el control e infectado.
9. Sin embargo, el efecto del TGF- β fue diferente dependiendo del inhibidor enzimático: no fue capaz de superar el efecto inhibitorio de OSMI-1, pero mostró un efecto estimulador al ser empleado en conjunto al inhibidor de OGA.
10. En términos generales, los resultados anteriores sugieren que la alteración de la O-GlcNAcilación favorecen la infección viral.
11. Por su parte, el TGF- β parece mostrar un efecto de estimulación de la infección viral suplementario, no dependiendo de la vía de la hexosaminas, pero sí de la OGT.

Sin embargo, estos resultados deberán ser confirmados con nuevas condiciones experimentales, con el fin de poder proponer un mecanismo de acción.

10. PERSPECTIVAS

A causa de la situación de emergencia que se vivió debido a la pandemia por el SARS-Cov2, muchos de los experimentos se iniciaron tarde. Sin embargo, a pesar de eso se obtuvieron resultados interesantes que nos permitieron concluir el proyecto. Para tener más resultados, se recomienda continuar realizando ensayos en los cuales se manejen diferentes aspectos dentro de este proyecto.

Cabe mencionar que, debido a la falta de viales virales (Influenza A H1N1 cepa New caledonia 99) se utilizaron líquido alantoideo infectado por VIA para concluir el proyecto; se recomienda repetir ensayos ya con un lote de virus cuantificado para corroborar los resultados obtenidos con el líquido alantoideo.

Así mismo, se recomienda analizar una por una de las bandas mostradas en los western blot realizados para O-GlcNAcilacion, lo cual nos abrirá una pauta a diversos resultados y así analizar por medio de microarreglos o proteómica las proteínas que muestran diferentes densidades conforme a los tratamientos aplicados mencionados previamente, esto para determinar que proteínas son las que se encuentran vinculadas en esos procesos.

También, se recomienda realizar ensayos donde se modifique el medio en el cual se cultivan las células, disminuyendo su suplemento de glucosa, para verificar si la glucosa que ya contiene el medio modifica o altera el proceso de infección por el virus de influenza, al mismo tiempo que de la O-GlcNAcilación.

Al mismo tiempo, se recomienda probarlo en un modelo *in vivo* para comprobar el efecto de la GlcN y los inhibidores de OGT y OGA en un sistema completo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aluwihare P, Munger JS. (2008). What the lung has taught us about latent TGF-beta activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 39(5); p: 499-502.
2. Angelova, M., et al. (2015).. Inhibition of O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Reduces Replication of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J Virol*, 89(16); p:8474-83.
3. Arias, Carlos-F., López, Susana. (2009). Anatomía del virus de la Influenza A H1N1 2009. *Revista Ciencia.* 60; p:14-24.
4. Banerjee, P.S., O. Lagerlof, and G.W. Hart. (2016). Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med*, 5; p:1-15.
5. Baudoin, L. and T. Issad. (2015). O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5; p:235.
6. BustosRivera-Bahena G, Lopez-Guerrero DV, Marquez-Bandala AH, Esquivel-Guadarrama FR, Montiel-Hernandez JL. (2021). TGF-beta1 signaling inhibit the in vitro apoptotic, infection and stimulatory cell response induced by influenza H1N1 virus infection on A549 cells. *Virus Res.* 297:198337.
7. Carlson CM, Turpin EA, Moser LA, O'Brien KB, Cline TD, Jones JC, et al. (2010). Transforming growth factor-beta: activation by neuraminidase and role in highly pathogenic H5N1 influenza pathogenesis. *PLoS Pathog.* 6(10); e1001136.
8. CDC. (2015). La temporada de influenza. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., CDC; <https://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season.htm>
9. CDC (2021). Acerca de la influenza | CDC. <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/index.html>.
10. CDC (2021). Tipos de virus de Influenza | CDC. <https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
11. Chen S, Tuttle DL, Oshier JT, Knot HJ, Streit WJ, Goodenow MM, et al. (2005). Transforming growth factor-beta1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1alpha-stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1 entry in human monocyte-derived macrophages. *Immunology.* 114(4); p:565-74.

12. Cheung, T.K. and L.L Poon. (2007). Biology of Influenza A Virus. *Ann N Y Acad Sci.* 1102; p:1-25.
13. Chiaradonna, F., Ricciardiello, F., Palorini, R. (2018). The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *MDPI.* p:1-29.
14. Comelli, E.M., et al. (2006). Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J Immunol.* 177(4); p:2431-40.
15. Comer, F.I. and G.W. Hart. (1999). O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1473(1); p:161-71.
16. Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Pan WC, Huang JF, Hsieh MY, et al. (2008). Association between transforming growth factor-beta 1 polymorphism and virologic characteristics of chronic hepatitis C. *Transl Res.* 152(4); p:151-6.
17. Denney L, Branchett W, Gregory LG, Oliver RA, Lloyd CM. (2018). Epithelial-derived TGF-beta1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection. *Mucosal Immunol.* 11(2); p:523-35.
18. Ferrer, CM. et al. (2016) O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling. *J Mol Biol.* 428; p:3282-3294.
19. Flint, J. Racaniello, VR., Rall, GF., Skalka, AM. and Enquist, LW. (2015). Principles of Virology. Vol I. ASM Press, Washington, D.C., EUA. p:574.
20. Freshney, R. (2005) Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th. ed. Wiley. p:696.
21. Furuya Y, Furuya AK, Roberts S, Sanfilippo AM, Salmon SL, Metzger DW. (2015). Prevention of Influenza Virus-Induced Immunopathology by TGF-beta Produced during Allergic Asthma. *PLoS Pathog.* 11(9); e1005180.
22. Gabius, H.-J. et al. (2009) The sugar code. Fundamentals of glycosciences. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Germany p.569.
23. Galvan, M., et al. (1998) Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from naïve cells. *J Immunol.* 161(2); p:641-8.
24. Golks, A., et al. (2007) Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J.* 26(20); p:4368-79.

25. Graham, D.R., et al. (2008) Two-dimensional gel-based approaches for the assessment of N-Linked and O-GlcNAc glycosylation in human and simian immunodeficiency viruses. *Proteomics*. 8(23-24); p:4919-30.
26. Groussaud, D., et al. (2017) Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS Pathog*. 13(7); p:e1006518.
27. Gu, J. and N. Taniguchi. (2008) Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell Adh Migr*. 2(4); p:243-5.
28. Gu, J., et al. (2009) A mutual regulation between cell-cell adhesion and N-glycosylation: implication of the bisecting GlcNAc for biological functions. *J Proteome Res*. 8(2); p:431-5.
29. Hanover, J.A., M.W. Krause, and D.C. Love. (2012) Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(5); p:312-21.
30. Hart, G.W., et al. (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*. 80; p:825-58.
31. Herold, S., et al. (2015) Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J*. 45(5); p:1463-78.
32. Hutchinson, EC. (2018) Influenza virus. *Trends Microbiol*. 26 p:809-810.
33. Issad, T. and M. Kuo. (2008) O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrinol Metab*. 19(10); p:380-9.
34. Jochmann, R., et al. (2013) O-GlcNAc transferase inhibits KSHV propagation and modifies replication relevant viral proteins as detected by systematic O-GlcNAcylation analysis. *Glycobiology*. 23(10); p:1114-30.
35. Jochmann, R., et al. (2009) O-linked N-acetylglucosaminylation of Sp1 inhibits the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol*. 83(8); p:3704-18.
36. Karimi-Googheri M, Daneshvar H, Nosratabadi R, Zare-Bidaki M, Hassanshahi G, Ebrahim M, et al. (2014) Important roles played by TGF-beta in hepatitis B infection. *J Med Virol*. 86(1); p:102-8.

37. Kim, S.H., et al. (2017) O-linked-N-acetylglucosamine transferase is associated with metastatic spread of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins to the lungs of mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 483(2); p:793-802.
38. Ko, Y.C., et al. (2012) Suppressive regulation of KSHV RTA with O-GlcNAcylation. *J Biomed Sci.* 19; p:12.
39. Kudlow, J.E. (2006) Post-translational modification by O-GlcNAc: another way to change protein function. *J Cell Biochem.* 98(5); p:1062-75.
40. Larson C, Oronsky B, Carter CA, Oronsky A, Knox SJ, Sher D, et al. (2020) TGF-beta: a master immune regulator. *Expert Opin Ther Targets.* 24(5); p:427-38.
41. Lefebvre, T. and T. Issad. (2015) 30 Years Old: O-GlcNAc Reaches the Age of Reason - Regulation of Cell Signaling and Metabolism by O-GlcNAcylation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 6; p:17.
42. Levine, Z.G. and S. Walker. (2016) The Biochemistry of O-GlcNAc Transferase: Which Functions Make It Essential in Mammalian Cells? *Annu Rev Biochem.* 85; p: 631-57.
43. Ley, K. and G.S. Kansas. (2004) Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 4(5); p:325-35.
44. Lodyga M, Hinz B. (2020) TGF-beta1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Semin Cell Dev Biol.* 101; p:123-39.
45. Love, D.C. and J.A. Hanover. (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE.* 2005(312); p:re13.
46. Machacek, M., C. Slawson, and P.E. Fields. (2018) O-GlcNAc: a novel regulator of immunometabolism. *J Bioenerg Biomembr.*
47. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. (2002) TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit.* 8(7); p:RA145-51.
48. Marshall, S.; Nadeau, O.; Yamasaki, K. (2004) Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: Differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels. *J. Biol. Chem.* 279; p:35313–35319.

49. Martinez-Duncker, I., et al. (2008) Trastornos congénitos de la glicosilación: abordaje clínico y de laboratorio. *Acta Pediátrica Mexicana*. 29(2); p:78-88.
50. Mishra, S., S.R. Ande, and N.W. Salter. (2011) O-GlcNAc modification: why so intimately associated with phosphorylation? *Cell Commun Signal*. 9(1); p:1.
51. O'Neill, R. O., Talon, J., Palese, P. (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal*. Vol. 17. No. 1. p:288-296.
52. Ohtsubo, K. and J.D. Marth. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. 126(5); p:855-67.
53. Organización Panamericana de la Salud. (2020). Informe de situación de Influenza | OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/informe-situacioninfluenza?topic=All&d%5Bmin%5D=&d%5Bmax%5D=&page=0>.
54. Ortín, J. (2009) Biología molecular del virus de la gripe. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. p:35-75
55. Pion M, Jaramillo-Ruiz D, Martinez A, Munoz-Fernandez MA, Correa-Rocha R. (2013) HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. *AIDS*. 27(13); p:2019-29.
56. Rabinovich, G.A., Y. van Kooyk, and B.A. Cobb. (2012) Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 1253; p:1-15.
57. Ranuncolo, S.M., et al. (2012) Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 287(28); p:23549-61.
58. Roberson EC, Tully JE, Guala AS, Reiss JN, Godburn KE, Pociask DA, et al. (2012) Influenza induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12-dependent apoptosis, and c-Jun N-terminal kinase-mediated transforming growth factor-beta release in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 46(5); p:573-81.
59. Roos, M.D., et al. (1997) O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol*. 17(11); p:6472-80.

60. Rowan AG, Fletcher JM, Ryan EJ, Moran B, Hegarty JE, O'Farrelly C, et al. (2008) Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. *J Immunol.* 181(7); p:4485-94.
61. Saito A, Horie M, Nagase T. (2018) TGF-beta Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 19(8).
62. Secretaria de salud. (2015) Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Influenza estacional, G.d.r. rápida, Editor. secretaria de Salud: CDMX. P:1-6.
63. Samji, T. (2009) Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med.* 82; p:153-159.
64. Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. (1996) Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol.* 70(12); p:8624-9.
65. Sharma, N.S., A.K. Saluja, and S. Banerjee. (2017) "Nutrient-sensing" and self-renewal: O-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr.*
66. Song, N. et al. (2019) MAVS O-GlcNAcylation Is Essential for Host Antiviral Immunity against Lethal RNA Viruses. *Cell Rep.* 28; p:2386-2396.
67. Sutton, P., R.W. Stoddart, and I.V. Hutchinson. (1992) Altered patterns of glycosylation on rat lymphocytes associated with activation. *Immunology.* 76(3); p:472-7.
68. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens. (2008) The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol.* 3; p:499-522.
69. Tinoco R, Alcalde V, Yang Y, Sauer K, Zuniga EI. (2009) Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity.* 31(1); p:145-57.
70. Toscano, M.A., et al. (2006) Interacción entre proteínas y galicanos en la regulación fisiológica de las células T. *Medicina (B. Alres).* 66(4); p:357-362.
71. Toscano, M.A., et al. (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol.* 8(8); p: 825-34.
72. Trapannone R, et al. (2016) O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochemical Society Transactions* 44; p:88-93

73. Travis MA, Sheppard D. (2014) TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 32; p:51-82.
74. Vaidyanathan, K., S. Durning, and L. Wells. (2014) Functional O-GlcNAc modifications: implications in molecular regulation and pathophysiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49(2); p:140-63.
75. Varki, A., et al. (1999) *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA. p:823.
76. Varki, A., J.D. Esko, and K.J. Colley. (2009) Cellular Organization of Glycosylation, in *Essentials of Glycobiology*, nd, et al., Editors. Cold Spring Harbor (NY).
77. Vosseller, K. et al. (2002) Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *PNAS* 99; p:5313-18
78. Wang, Q., et al. (2020) O-GlcNAc transferase promotes influenza A virus-induced cytokine storm by targeting interferon regulatory factor-5. *Science Advances.* 6; p: eaaz7086.
79. Wang, Z., M. Gucek, and G.W. Hart. (2008) Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(37); p:13793-8.
80. Watanabe, Y., Bowden, T., A., Wilson, I., A., Crispin, M. (2019) Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathology. *BBA-General Subjects* 1863. P:1480-1497.
81. Wells, L., S.A. Whelan, and G.W. Hart. (2003) O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun.* 302(3); p:435-41.
82. Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. (2004) Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol.* 17(1); p:109-13.
83. World Health Organization. (2013) *Ressources documentaires sur la grippe.* Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/influenza/resources/es/>
84. Xing, D., et al. (2011) O-GlcNAc modification of NFkappaB p65 inhibits TNF-alpha-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One.* 6(8); p:e24021.

85. Yao J, Lin C, Jiang J, Zhang X, Li F, Liu T, et al. (2021) lncRNA-HEIM Facilitated Liver Fibrosis by Up-Regulating TGF-beta Expression in Long-Term Outcome of Chronic Hepatitis B. *Front Immunol.* 12; p:666370.
86. Yeon Jung Kim, Min Jueng Kang, Eunah Kim, et al. (2020) GlcNAc stabilizes SMAD4 by inhibiting GSK-3 β -mediated proteasomal degradation. *Scientific Reports.* 10:19908. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76862-0>
87. Zachara, N.E. and G.W. Hart. (2006) Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta.* 1761(5-6); p:599-617.
88. Zachara, N.E. and G.W. Hart. (2002) The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev.* 102(2); p:431-8.
89. Zambon, M.C. (2001) The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol.* 11(4); p:227-41.
90. Zeidan, Q. and G.W. Hart. (2009) The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci.* 123(Pt 1); p:13-22.

Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Asociación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β con la infección *in vitro* por el virus Influenza H1N1**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Samantha Núñez Rueda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Juan José Acevedo Fernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2022-05-13 15:52:48 | Firmante

aaUJb6vuPt9nXqWxwdNg2Ud+pPled34vi046heTJo5RzIbBI5roOOFYhXdCLlw/5XQ8VLM/z0X54bI5F+HT7gBoWOZsou7xh44vLr19xiZcvEFydca1vPgimnPMGk1f/am10tGHJGg/0YUF+57r6GZL3rUp4X3o2D9roJHt6zIzXVP3Z3iaMEyz/vJKKeyFdPEowtPhInm05/BF19sckKUCwQm8w9ZjgTyUztdvODULjWb/QSpjGhZCL70bOP0i2ii37V0q/SnEhpBvRniezHXIB9QLP/4CBQM6vbvwABQK8iG81kxdb6F716jyU5oeS2MiMcPYvHF9r/3gs0rYD9g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[USqAZ7rGt](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6soN8mkVXucfcUE2iOX2obDA3hM7Y59d>



Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Asociación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β con la infección *in vitro* por el virus Influenza H1N1**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Samantha Núñez Rueda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. José Luis Montiel Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2022-05-13 15:51:18 | Firmante

I32u/IH9/GS2IJs5hVx126WR/WgWPSQsemq0qLkg98liMAMtKrPjrquYHfl583XjTQ2asCRPCjF36VzbG7vjPi1uxFNtORbGv4ksZH4anYYuY69in0a9px5hfnS7iz+UoGFjNivP7Wglp+4YDAIEiKBV7rVRlpSwGlZPz2ASQZbwxKH0u9x7shHu4Us+J1vA3cltjeYKBiYTDap3VvRZOCCm1tF3MC2iCMnk335l48Pmkq10F7fY/IWxi0bdBy2ttKLsokUa0maCEP+VgOqS479xg9GT+EDFs5DgFhqVZkYmVuKsZYXUp7KwnEOvf8/ySBwCIWpMY2JG1suu94HgA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[PTbep0WqG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/oeuzw014LMQ5zTuugGGYSx8v9oC5Gxk0>



Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Asociación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β con la infección *in vitro* por el virus Influenza H1N1**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Samantha Núñez Rueda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Tomás David López Díaz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ | Fecha:2022-05-19 13:12:18 | Firmante

MepmDTr+q7+LJLaFutJRUGeE8xtLUqpCZvdro0dheu4K+vFxl2G6xB2Dct8kvzCp4z5JoO0A+zDqrru0ttaPF21jSNRhp1ZGzPBGd9kEb+B75jubY5VZXrkmZWY9xiqHnWeysMKfLdV119nDbq/m+0waeQ9gcF2BZH+8teyqeJn57v4sMI49QeapKg7odKI61WrBEgWDsHU/Ex5wDNvRwWQqut3A8YhNpy45BAvmQlvjDsg/Ocu7ypMipw2PPCVsxSBW2WulydhDIU2izBE0XYymN9QiEPJB86+yYyAMLoeFa+CE+5tBCtbShvJITAB6O9iAcS8zl6GeUhtACK66w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[AktHUbSdo](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/b44ct9thFkv0spfgG4Dk3fXgBet6MEuB>



Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Asociación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β con la infección *in vitro* por el virus Influenza H1N1**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Samantha Núñez Rueda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Hilda Rangel Flores



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HILDA RANGEL FLORES | Fecha:2022-05-23 14:06:52 | Firmante

yNvm4C1MRAk1CauobqLGTp33Z3LEDPA/9U++qR44j9GaHqvWZqNGgqvp8caAiALK3fQwJ4fuGIDEQFPyWSNybo5c6+mF1BAf8+j695RPsMjed522faYeXZXgRLYF+s0Mks65MiSNjEbZZxfHKFlw6FvdXWVlifHK/K8D/mQn//uJe5WS0DePhD+84Wwp7kKHYWZljzW3au15HqxSgQMHT9eCrM9hmfo3UzC9SHxhcKtX8L1/C8x2BzEsEHbUScVFgHiwRMmjrofqVzr4lrPIRPYLA3rNYvTbYpsbQvao9cSn56F5eWcCcDYkV/mE00pb2wFV/NhN+fLCyjvO1NtiA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Df4txMhX0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8NYniSSKnn9hc6E3FUqzYiNpHHlurSdo>



Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Asociación entre la O-GlcNAcilación y el TGF- β con la infección *in vitro* por el virus Influenza H1N1**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Samantha Núñez Rueda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2022-05-24 11:21:06 | Firmante

YXtWb8yY8TWtZigj9jqk5Qk+zZJPhxO6IPBvJHsIneZkelaoFvYCVGrDBQ8TkfUAEGl7NHEXF1Z5/xk5uAz/yWQnQWt6r5Ybip6EYwVTfeZLvBNnMtsBJUmIJTCYwYHmIALP1jWJ6GhDFcDvh9vAG/bl+5ZlzRlv/tBF+vnTEAPTdNgXOqkrO7YNgSed00bJWfy431443+HLKQb7Du0qHqj2PJKKUL8zYsQ71OPjgk6clBvSP7mhovkTwLHuEI9S8KesnsDJW1dLVAnK647DbYhNna8FsnLkn+XBMI1QIYXAEhN2f3Dq+0DKiS93xY3EsdSN/EkC+qdwOQk6vR1g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[hngcXVN3Y](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hqRnrRxZzEdPuxr5wcnbmjwxy5Qoi94w>

