



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Análisis del efecto de la administración del antagonista  
del receptor CCR3, SB-328437, en el reclutamiento de  
neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza  
A-H1N1**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**FÁTIMA LÓPEZ LEAL**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. ARACELI PÉREZ LÓPEZ**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo. de México, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*"Life is what happens to you  
While you're busy making other plans"  
-John Lennon*

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología e Interacciones Microorganismo-Hospedero, UBIMED, FES-Iztacala, UNAM bajo la tutoría de la Dra. Araceli Pérez López, con el apoyo financiero del Programa de Apoyos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA)-UNAM, proyecto 1A208222 y el proyecto EDOMÉX-FICDTEM-2022-02 #128 Redes de Colaboración, Conocimiento e Innovación EDOMEX, COMECYT.

Así mismo, recibí una beca como estudiante de licenciatura del proyecto EDOMÉX-FICDTEM-2022-02 #128 Redes de Colaboración, Conocimiento e Innovación EDOMEX, COMECYT. Agradezco el apoyo de la Unidad de Citometría de la Red de Apoyo a la Investigación, UNAM en el análisis de muestras mediante citometría de flujo.

Agradezco a los miembros de mi comité: **Dra. Araceli Pérez López**, por confiar en mí para realizar este proyecto, por dedicarme siempre el tiempo y paciencia para compartir su conocimiento, experiencia y por siempre contagiarme su entusiasmo por la investigación aun cuando las cosas parecían no salir como lo esperado. Al **Dr. José Bustos Arriaga**, por haberme aceptado en su grupo de trabajo y por permitirme crecer académicamente, por siempre compartir su tiempo y conocimientos conmigo y, sobre todo, por encaminarme en el gran mundo de la virología. A la **M. en C. Tannya Karen Castro Jiménez**, quiero agradecer no solo por todo el apoyo académico, sino también por el apoyo moral, por siempre tener las palabras adecuadas para alentarme y por formarme, eres una gran persona y un gran ejemplo académico y personal. A la **M. en C. Tecilli Cabellos Avelar**, agradezco todo el apoyo técnico que me brindó en el desarrollo de este trabajo, así como su dedicación, orientación y enseñanzas durante todo el proceso. Al **Dr. José Luis Reyes Hernández**, le agradezco profundamente su colaboración, la disposición que siempre tuvo para ayudarme, así como el entusiasmo me transmitió en las distintas etapas de mi formación.

Finalmente quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros del laboratorio, en especial a **Isaac, Kelly, Mario, Mariana y Katherine**, A lo largo de este camino, hemos enfrentado desafíos juntos, celebrado logros y hemos aprendido unos de otros, les agradezco tanto todas las risas, aprendizajes y experiencias que hemos compartido, sin ustedes mis días en el laboratorio y los experimentos no hubieran sido los mismos.

## Dedicatorias

°-+“And I thank you  
For bringing me here  
For showing me home  
For singing these tears  
Finally I've found  
That I belong here” -+°

-Depeche Mode

Al reflexionar sobre el término de este capítulo en mi vida, me siento feliz y honrada por la oportunidad de expresar mi gratitud a quienes desempeñaron un papel importante en este largo viaje lleno de aprendizajes; el apoyo de cada uno de ustedes me ha traído hasta el día de hoy.

Esta tesis, está dedicada principalmente a mis padres, **Patricia Leal Miranda** y **Armando López Monroy**, de quienes podría escribir otra tesis entera llena de agradecimientos, ya que día a día han llenado mi vida y nuestra casa de mucho amor, naturaleza, libros, música y quienes desde pequeña me demostraron que yo podía hacer lo que quisiera hacer y ser quien quisiera ser, gracias por todo lo que hacen por mí, son mi mayor inspiración y todos mis logros en la vida son por y para ustedes, los amo infinitamente. A mi abuelo **José Leal** y a la memoria de mis abuelos **María de Jesús Miranda**, **Juana Monroy** y **Armando López**, quienes siempre me demostraron un amor incondicional y cuyas historias de resiliencia, perseverancia y enseñanzas me han formado en la persona que soy, y sobre todo, que continúan acompañándome en todo mi proceso siendo una constante fuente de inspiración y guía.

A mi prima **Alba Sofía**, gracias por estar conmigo desde el inicio de esta etapa, has sido un pilar importante para mí, siempre escuchándome, apoyándome y motivándome no solo con las palabras correctas, sino también con todas las aventuras que has compartido conmigo, gracias por siempre estar y por tu amistad, te quiero mucho **Bina**. **Alejandra Leal**, gracias por ser un gran ejemplo en mi vida, por compartir conmigo experiencias que solo había soñado y por siempre estar ahí para mí con risas, buenos consejos y muchas aventuras. **Alma Delia**, agradezco mucho todas las reuniones de fines de semana que hemos compartido, por todo tu cariño y ayuda incondicional, al igual que mis primos **Aaron** y **Abraham**, con quienes he crecido y a los cuales les deseo que sigan sus sueños y que hagan siempre lo que les haga feliz. A mis primas **Sairel** y **Yazmin**, porque a pesar de la distancia que nos puede separar, cada vez que nos vemos es una aventura distinta llena de anécdotas, música y experiencias nuevas, gracias por compartir tanto y por siempre estar en los momentos importantes de nuestras vidas, ¡las quiero mucho!.

**Renee** y **Gaby Morales**, han estado en mi vida desde hace 14 años y han sido una parte fundamental en mi crecimiento personal, me han apoyado desde el primer momento en el que supe cuál era mi vocación y con sus palabras, ánimos, conciertos, pijamadas, viajes y risas me han ayudado a salir adelante, estoy eternamente agradecida por tenerlas en mi vida y por el amor incondicional que me han brindado a lo largo de todos estos años, siempre celebrando mis logros como si fueran los suyos e inspirándome para salir adelante, las amo con todo mi corazón. A mis amigas que conocí en la licenciatura: **Mariana**, **Tania**, **Daniela**, **Aurora**, **Mafer**, **Ximena** y

**Montse**, desde mi primer día en la facultad han estado conmigo, ya sea con risas entre clases, viajes en el suburbano, prácticas de campo y salidas juntas, gracias a todas por seguir en mi vida a pesar de haber pasado por una pandemia, por siempre estar para mí no solo académicamente, sino también con su amistad y palabras de motivación, gracias por ser parte de mi vida y por hacer de esta experiencia universitaria algo inolvidable. **Jose Tellez**, encontrarnos en esta etapa ha sido de las mejores coincidencias de mi vida, te agradezco tanto tu paciencia en los días de experimentos largos, por siempre tener las palabras correctas para ayudarme a salir adelante, por creer en mí en esta recta final, por todo tu amor, tu amistad, tus consejos y tu sinceridad, gracias por hacer mejores mis días, a tu lado he encontrado la fuerza para enfrentar todos los desafíos que me pone la vida y la felicidad para celebrar mis triunfos, te amo y siempre te llevaré en mi corazón.

A toda mi familia que ya sea a la distancia o en reuniones me han demostrado siempre su apoyo y cariño, especialmente gracias a **José Juan, Dolores, Pepe, Gaby, Bere, Miguel, Lilia, Lety, Andrés, Pavel y Joel**.

Por último, quiero dedicar un espacio para agradecer a aquellos animales de experimentación cuyo sacrificio formó parte de este proyecto, ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

*“Every night I used to pray that I'd find my people  
And finally I did, on the open road.  
We had nothing to lose, nothing to gain  
Nothing we desired anymore  
Except to make our lives into a work of art”*

*-Lana del Rey*

°9♥℞°

## Índice

Resumen .....	8
Abreviaturas.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Epidemiología .....	11
1.2 Generalidades del virus Influenza .....	12
1.3 Estructura del virus de la influenza A.....	12
1.4 Ciclo replicativo .....	13
1.5 Generalidades de la respuesta inmune contra influenza .....	15
1.6 Papel de los neutrófilos durante la infección por influenza .....	16
a) Generalidades de los neutrófilos .....	16
b) Producción y maduración de los neutrófilos .....	17
c) Mecanismos efectores de los neutrófilos .....	17
d) Neutrófilos e infección por influenza .....	19
2. HIPÓTESIS.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. OBJETIVOS .....	23
4.1 Objetivo general .....	23
4.2 Objetivos particulares .....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
5.1 Animales de experimentación .....	23
5.2 Virus influenza H1N1 .....	23
5.3 Infección y tratamiento de ratones .....	23
5.4 Recolección de muestras.....	24
a) Sangre .....	24
b) Lavado broncoalveolar.....	25
c) Obtención de suspensión celular a partir de tejido pulmonar .....	25
d) Médula ósea.....	25
5.5 Cuantificación de células totales de lavado broncoalveolar .....	25
5.6 Cuantificación de proteínas totales en lavado broncoalveolar por método Bradford .....	26
5.7 Tinción para citometría de flujo .....	26
5.8 Estrategia de análisis mediante citometría de flujo .....	27

5.9 Extracción de ARN y RT-PCR .....	28
6. RESULTADOS .....	30
6.1 Determinación de la dosis de infección de influenza H1N1 en ratones C57/BL6 .....	30
6.2 El pico máximo de reclutamiento de neutrófilos al pulmón y expresión de CCR3 ocurre al día 4 post-infección .....	32
6.3 El antagonista SB348437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A .....	32
6.3 La administración del antagonista SB-328437 no afecta la expresión de los receptores CCR3 y CXCR2 en neutrófilos.....	34
6.5 La administración del antagonista SB-328437 reduce la expresión de citocinas inflamatorias y puede reducir la carga viral durante la infección por influenza A .....	36
7. DISCUSIÓN .....	39
8. CONCLUSIONES .....	43
9. PERSPECTIVAS .....	43
10. REFERENCIAS .....	44



## Resumen

Los neutrófilos representan una de las primeras líneas de defensa del sistema inmune contra patógenos invasores, sin embargo, una activación descontrolada puede ocasionar daño al hospedero. Un ejemplo de ello es la infección por el virus de Influenza A, en el cual una de las complicaciones más comunes es el desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), en el cual la infiltración de neutrófilos en el pulmón es una de las características distintivas. Durante condiciones inflamatorias, los neutrófilos adquieren la expresión de nuevos receptores, los cuales pueden amplificar las respuestas de los neutrófilos. Se ha demostrado en estudios previos que los neutrófilos reclutados en la mucosa pulmonar durante infecciones bacterianas regulan la expresión de CCR3 positivamente y que una estimulación *ex-vivo* de este receptor da como resultado una mayor activación de neutrófilos. Es por esto que, el objetivo de este trabajo consistió en determinar si el bloqueo del receptor CCR3 mediante el uso del antagonista específico SB-328437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A H1N1 en ratones.

Utilizando un modelo de infección con el virus de influenza A pandémico pdm09 se determinó que existe un pico máximo de reclutamiento de neutrófilos al pulmón alrededor del día 4 post-infección y que la mayoría expresan el receptor CCR3. Mediante una administración intraperitoneal del antagonista específico SB-328437 se redujo el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón, además, en ratones infectados con influenza, un tratamiento de SB-328437 redujo significativamente la administración de *Tnfa* y *Cxcl1* y muestran una menor expresión del gen M de la influenza, lo que sugiere una reducción en la carga viral.

En conjunto, estos resultados sugieren que un bloqueo del receptor CCR3 podría ser una estrategia para prevenir la activación descontrolada de los neutrófilos que resulta perjudicial para el huésped durante infecciones virales como Influenza A-H1N1, pero preservar suficiente respuesta efectora para controlar el patógeno.

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**BSA:** Albúmina de suero bovino (del inglés, bovine serum albumin)

**β-actina:** Beta actina

**cDNA:** ADN complementario

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**Dpi:** Días post infección

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**HA:** Hemaglutinina

**Hpi:** Horas post infección

**IFN-I:** Interferones humanos tipo I

**IL-8:** Interleucina 8

**LBA:** Lavado broncoalveolar

**LPS:** Liposacárido

**MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés, major-histocompatibility)

**MMP:** Metaloproteinasas de la matriz (del inglés, matrix metalloproteinases)

**MPO:** Mieloperoxidasa

**NA:** Neuraminidasa

**NADPH oxidasa:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (del inglés, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)

**NE:** Elastasa de neutrófilo

**NETs:** Trampas extracelulares de neutrófilo (del inglés, neutrophil extracellular traps)

**NK:** Células asesinas naturales (del inglés, natural killer)

**PAMPS:** Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, pathogen-associated molecular patterns)

**PBS:** Buffer fosfato salino (del inglés, phosphate buffered saline)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)

**PRR:** Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, pattern recognition receptor)

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (del inglés, reactive oxygen species)

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SB-328437:** (S)-Methyl-2-naphthoylamino-3-(4-nitrophenyl) propionate

**SDRA:** Síndrome de dificultad respiratoria aguda

**TA:** Temperatura ambiente

**TLR:** Receptor tipo Toll (del inglés, Toll-like receptor)

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**UFP:** Unidades formadoras de placa

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología

La influenza es una enfermedad viral altamente contagiosa, la cual puede provocar síntomas respiratorios leves que generalmente se limitan al tracto respiratorio superior, sin embargo, las infecciones más graves por el virus de la influenza generalmente se asocian con infecciones del tracto respiratorio inferior que conducen a neumonía inducida por virus o bacterias, que puede ser fatal (Mifsud et al., 2021). Por otra parte, las personas mayores y aquellas con afecciones médicas preexistentes pueden ser más vulnerables a enfermedades más graves y las epidemias de influenza tienden a tener el mayor impacto en estos grupos, es decir, los niños, personas mayores y mujeres embarazadas, además de todos los pacientes inmunocomprometidos y aquellos con comorbilidades (Macias et al., 2021).

En las zonas templadas de los hemisferios norte y sur, la influenza es estacional y se limita a los meses más fríos del invierno; y en las zonas tropicales, está restringido a las estaciones húmedas. Se han sugerido factores como la ventilación reducida, el hacinamiento en interiores y una mayor supervivencia de los virus en aerosol en las condiciones de baja temperatura y alta humedad que se encuentran en el invierno (Stephenson & Zambon, 2002). Las pandemias son la expresión más severa de la influenza, ya que pueden infectar entre el 20 y el 40% de la población y generan alta mortalidad. Pueden tener varios orígenes; entre ellos, el reordenamiento entre virus de influenza de animales y humanos que genera un virus diferente y la transmisión directa y la adaptación de un virus de animales a los humanos (Organización Panamericana de la Salud (PAHO), 2001)

Las epidemias y pandemias de influenza pueden tener un impacto considerable en morbilidad y mortalidad de la población. Se estima que estas epidemias anuales ocasionan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedades graves y entre 290,000 y 650,000 muertes respiratorias a nivel mundial (World Health Organization (WHO), 2023). En abril de 2009 apareció en México y California (EE.UU.) un nuevo virus, responsable de las primeras pandemias del siglo XXI, el cual fué nombrado como A/(H1N1) pdm09, se trata de un virus recombinante cuádruple, que consta de dos virus de origen porcino, un virus de origen aviar y un virus de origen humano, el cual, en su primer año de circulación, se ha estimado que causó entre 123.000 y 203.000 muertes (Baldo et al., 2016; Simonsen et al., 2013). Aunque la inmunidad contra la reinfección con la misma variante puede ser de larga duración, ocurren un rápido cambios antigénicos en las variantes circulantes rápidamente, lo cual permite que los virus de la influenza escapen de la inmunidad de la población que se adquiere después de una epidemia (Ryu & Cowling, 2021).

Actualmente, la influenza continúa siendo un importante problema de salud pública en México, ya que en la última temporada estacional 2022-2023 se registraron 7,626 casos positivos para influenza A y 190,656 casos sospechosos a enfermedad respiratoria viral (Dirección General de Epidemiología (DGE), 2023).

## 1.2 Generalidades del virus Influenza

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, la cual pertenece al grupo V de virus con ARN monocatenario negativo de la clasificación de Baltimore. Actualmente se conocen 7 géneros en esta familia: *Alfainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Isavirus* y *Togotovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2023).

Los virus pertenecientes a *Betainfluenzavirus* (influenza B) y *Gammainfluenzavirus* infectan y ocasionan enfermedades en el humano, mientras que para *Deltainfluenzavirus* se han descrito únicamente infecciones en cerdos y bovinos; sin embargo, *Alfainfluenzavirus* (influenza A) es el responsable de todas las pandemias de las que se tienen registro e infecta a una gran variedad de especies animales, considerándose los patos y los gansos como los reservorios más importantes de este virus (Dubovi et al., 2011).

Dependiendo de las condiciones ambientales (p. ej. humedad y temperatura), el virus puede sobrevivir varias horas, en agua a bajas temperaturas (p. ej. <20 °C) puede sobrevivir hasta por varios meses. Los virus de la influenza son sensibles a los disolventes y detergentes lipídicos. También son vulnerables al calor y al pH bajo, según el tipo de virus (Scholtissek, 1985).

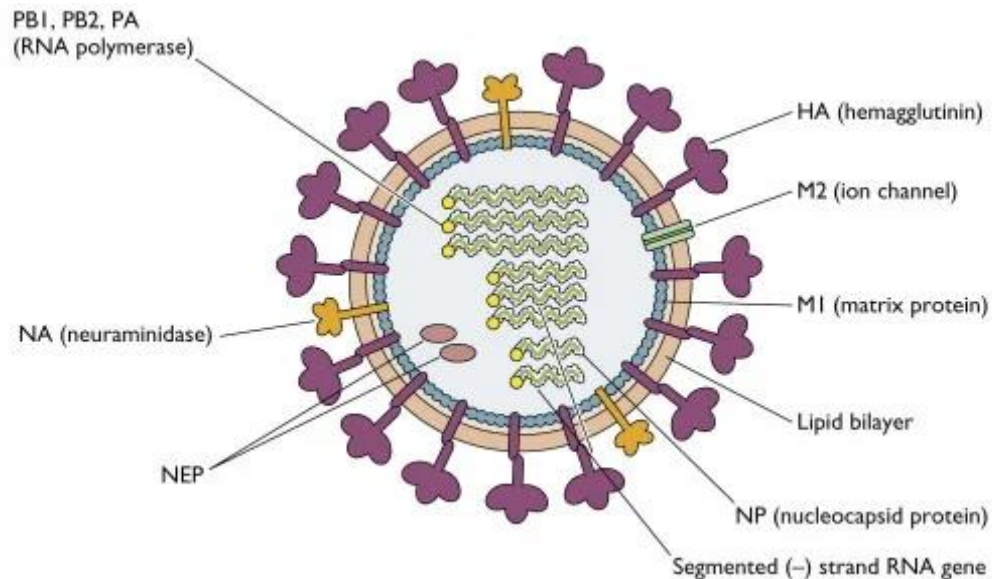
Se sabe que la transmisión de los virus de Influenza es predominantemente por aerosoles, es decir, gotas relativamente grandes (>5 µm) que se crean especialmente al hablar, toser o estornudar y que penetran en las mucosas mediante contacto a distancias cortas (Arbeitskreis Blut, Untergruppe «Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger», 2009). Sin embargo, en algunas publicaciones también se sugiere que la transmisión podría tener lugar a través de los llamados núcleos de gotas, que son más pequeños (<5 µm) y pueden permanecer más tiempo en el aire. Además, la transmisión puede ocurrir por contacto directo con superficies contaminadas con virus y el posterior contacto boca-nariz. Después de la infección, los virus se replican en las mucosas nasal y laríngea. Esta replicación también afecta las vías respiratorias inferiores a medida que avanza la infección (World Health Organization (WHO), 2023).

## 1.3 Estructura del virus de la influenza A

Los miembros de la familia *Orthomyxoviridae* son virus envueltos que contienen de 6 a 8 nucleocápsides helicoidales, sus viriones son de morfología esférica a filamentosa y tienen un tamaño aproximadamente de 100 nm de diámetro con picos de glicoproteínas (Payne, 2017).

Los virus de la influenza A presentan una membrana de lípidos que proviene de la célula hospedera; en esta envoltura se encuentran las proteínas estructurales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (**Figura 1**), los subtipos de influenza A se clasifican con base a estos antígenos; HA sirve como proteína de unión y proteína de fusión y se une a los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas y aglutina los glóbulos rojos, mientras que la NA es una exosialidasa que rompe los enlaces entre el ácido siálico y los residuos de carbohidratos adyacentes presentes en las glicoproteínas celulares y virales (Shtyrya et al., 2009). Así como también juega

un papel clave en la liberación del virión de la célula infectada (Arbeitskreis Blut, Untergruppe «Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger», 2009). La cubierta del virus de la influenza A contiene proteínas de la matriz (M1) y transmembranales (M2). La proteína M1 confiere rigidez a la capa bilipídica del virus, mientras que la proteína M2 es un canal iónico dependiente de pH (Shen et al., 2000).



**Figura 1.** Estructura del virus de la influenza (Tomado de: Ibekwe et al., 2021)

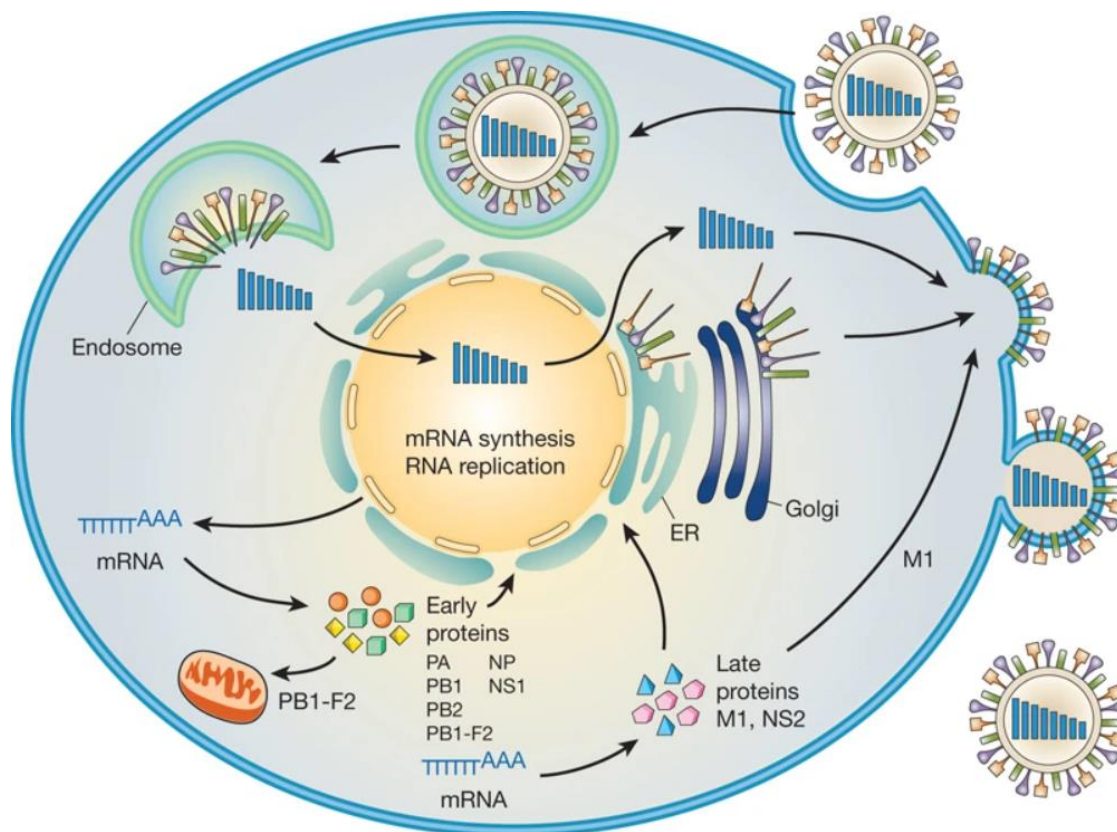
#### 1.4 Ciclo replicativo

La proteína hemagglutinina (HA) es la responsable de la adhesión del virus a la célula ya que se une a los residuos de ácido siálico en las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular (Klenk et al., 1975). Según la posición que tengan en su enlace con una galactosa de la membrana celular, los receptores de ácido siálico se dividen en dos tipos: los  $\alpha$ -2,6 y los  $\alpha$ -2,3. Los virus influenza humanos tienen una alta afinidad por los receptores  $\alpha$ -2,6 que se encuentran presentes en gran cantidad en el epitelio ciliado de la mucosa nasal y paranasal, faringe, tráquea y bronquios y en la conjuntiva ocular (Ramos & Fernandez-Sesma, 2012).

Posteriormente, el virus se internaliza mediante endocitosis mediada por clatrina o por macropinocitosis (Rust et al., 2004), donde el pH ácido del lumen induce la fusión de las membranas viral y endosómica, permitiendo que ocurra la liberación de los complejos ribonucleoproteínas virales (RNPv), los cuales ingresan al núcleo a través de poros nucleares, procesos que son realizados por las polimerasas virales (PA, PB1 y PB2) (Samji, 2009) y así comenzar la replicación del ARN viral (ARNv) y la posterior transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) a partir de los ARNv. Posteriormente, los componentes que se sintetizaron para la formación de RNPv y la nucleocápside son exportadas al núcleo hasta que la partícula viral esté lista para ser ensamblada. Por otra parte, las proteínas de membrana son transportadas y modificadas en el aparato de Golgi para posteriormente ser insertadas en la membrana celular,

Por último, ocurre el ensamblaje, donde permanece unido a la membrana celular hasta el momento de su liberación, en este proceso es fundamental que la NA rompa los residuos de ácido siálico que mantienen el virión unido a la célula infectada (Salomon & Webster, 2009).

Este es un momento crítico de ciclo replicativo viral susceptible de intervención terapéutica; los agentes antivirales oseltamivir y zanamivir son estructuralmente semejantes al ácido siálico, se unen e inhiben la NA, provocan aglomeración viral en la membrana celular e interrumpen el ciclo de replicación. Después de ocurrida la infección por el virus de la influenza pueden transcurrir entre 18 y 72 h antes del comienzo de la sintomatología clínica (Noda Albelo et al., 2010).



**Figura 2.** Ciclo replicativo de los virus influenza (Tomado de: Neumann et al., 2009)

## 1.5 Generalidades de la respuesta inmune contra influenza

Los virus de la influenza humana se replican en las células epiteliales del tracto respiratorio, el pico de replicación se presenta a las 48 horas después de la infección y empieza a declinar hasta el día 6 a 8. A mayor cantidad de virus producido, mayor severidad de los síntomas (Samji, 2009).

Para que se establezca una infección y se propague con éxito, el virus de la influenza debe evadir el sistema inmunológico innato, cuya función principal es prevenir o restringir la replicación viral. Una vez que el virus se ha implantado en el epitelio de las vías respiratorias, comienza a replicarse y diseminarse en el tracto respiratorio, causando la descamación de las células ciliadas y células secretoras de moco. Dentro de primeras respuestas del organismo contra la infección, debido a la liberación de distintos antígenos virales, se induce el reclutamiento de macrófagos, dendríticas y linfocitos para dar inicio a la respuesta inmune del hospedero (Mifsud et al., 2021).

El ARN viral que está dentro de las células infectadas es reconocido como extraño por varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR), lo que conduce a la secreción de interferones tipo I (IFN-I), citocinas proinflamatorias, eicosanoides y quimiocinas, las cuales causan inflamación local y sistémica (Zúñiga et al., 2011).

Las quimiocinas tales como CXCL1 y CXCL2 que se producen en el sitio de la infección reclutan células inmunes adicionales, incluidos neutrófilos, monocitos y células asesinas naturales (NK), hacia las vías respiratorias. Las células epiteliales infectadas se convierten en el objetivo de las células NK, que median la eliminación viral secretando citocinas que pueden contener la replicación viral al matar a las células infectadas (Tsioumpekou et al., 2023).

Los monocitos y neutrófilos se reclutan rápidamente en el pulmón infectado por el virus de la influenza y ayudan a eliminar las células muertas infectadas, junto con los macrófagos alveolares, la eliminación fagocítica de las células infectadas por virus mediante fagocitos reclutados proporciona un mecanismo importante de eliminación viral (Iwasaki & Pillai, 2014).

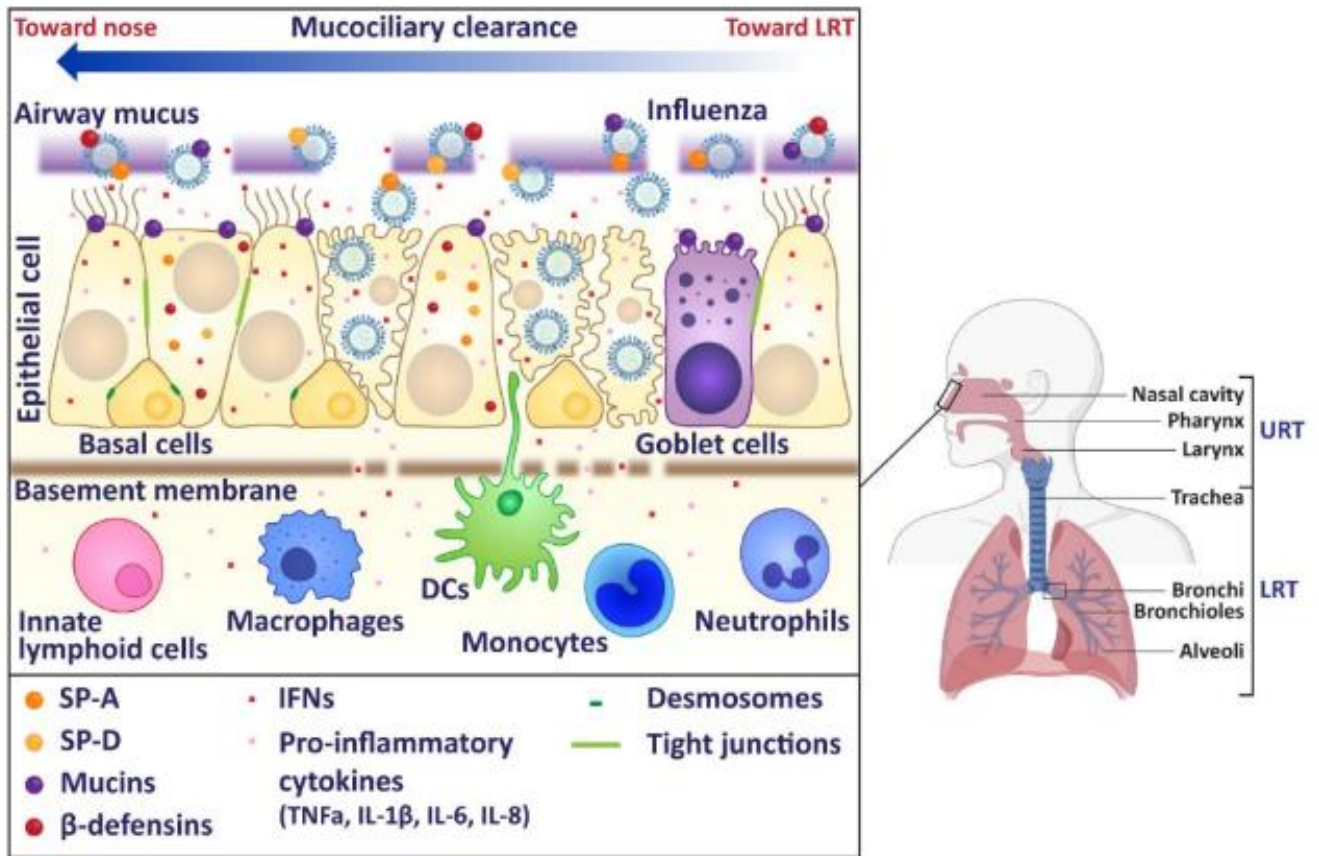
Sin embargo, si el virus logra establecer la infección a pesar de la activación de la respuesta inmune innata, la eliminación definitiva del virus requiere inmunidad adaptativa la cual genera anticuerpos contra los antígenos HA y NA. Los anticuerpos dirigidos contra la HA, tienen como función neutralizar al virus impidiendo la unión con el receptor ácido siálico, mientras que, los anticuerpos contra NA, reducen la eficiencia de la liberación del virus de las células infectadas y evitan que se infecten otras células (Yang et al., 2016).

Esta respuesta incluye la inmunidad humoral e inmunidad celular, la primera la realizan los linfocitos B y la segunda por los linfocitos T. Para que el virus sea reconocido es necesario que sea digerido por las células presentadoras de antígenos y que sea fragmentado en el interior de estas células hasta formar péptidos que se unen a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), las cuales llevan los péptidos a la superficie celular donde posteriormente serán reconocidos a través de su receptor (Chen et al., 2018).

Una vez que ocurre la presentación de antígeno en las células, inicia el reclutamiento de distintos linfocitos y células especializadas en la destrucción de las células infectadas para combatir la



infección. Por último, se forman células de memoria, que constituyen un factor importante para la protección contra futuras infecciones por el mismo tipo de virus de Influenza (Chen et al., 2018).



**Figura 3.** Esquema del tracto respiratorio y la respuesta inmune del hospedero contra virus influenza (Tomado de: Mifsud et al., 2021)

### 1.6 Papel de los neutrófilos durante la infección por influenza

#### a) Generalidades de los neutrófilos

Los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares, son fagocitos que juegan un papel importante en la defensa del huésped contra patógenos invasores, particularmente contra bacterias y hongos (Hidalgo et al., 2019). Los neutrófilos representan a la población de leucocitos más abundantes en circulación sanguínea en humanos (40 a 60%), mientras que en ratones representan un 10 a 25% de los leucocitos circulantes. Su tamaño aproximado es de 10 nm de diámetro para humanos y 7 nm de ratón, estos leucocitos se caracterizan por la morfología de su núcleo, teniendo una forma multilobulada con segmentos de tres a cinco lóbulos en neutrófilos humanos y en ratones, el núcleo se distingue por presentar lóbulos con forma anillada y un poco distinción de la segmentación del núcleo, lo cual permite diferenciarlos de otros leucocitos (Hidalgo et al., 2019; Veda, 2011)

El citoplasma de los neutrófilos contiene un gran número de gránulos y vesículas secretoras, los gránulos tienen la función principal de almacenar y liberar sustancias microbicidas como las defensinas y las catelicidinas. Estos gránulos son una herramienta para combatir agentes patógenos, liberando su contenido al medio extracelular o fusionándose con fagosomas como un producto de la fagocitosis (Cassatella et al., 2019).

### **b) Producción y maduración de los neutrófilos**

Los componentes celulares de la sangre se generan mediante el proceso de hematopoyesis en la médula ósea, donde, a partir de las células troncales hematopoyéticas, se pueden diferenciar en células progenitoras linfoides o mieloides (Doulatov et al., 2012). Las células progenitoras linfoides se caracterizan por dar origen a linfocitos T, B, células NK y dendríticas, mientras que las mieloides se pueden diferenciar en un progenitor megacariocito-eritroide o en un progenitor de granulocitos-macrófagos, a partir de los cuales se producen eritrocitos/megacariocitos y células mieloides como macrófagos, mastocitos, basófilos, eosinófilos y neutrófilos (Lawrence et al., 2018).

Durante el proceso de maduración de los neutrófilos murinos ocurren cambios en marcadores de membrana, tal es el caso de la molécula Ly6G, la cual incrementa su expresión conforme el neutrófilo alcanza su maduración (Ueda et al., 2005). Además de expresarse exclusivamente en neutrófilos, Ly6G es utilizado como un marcador para definir subpoblaciones de neutrófilos de acuerdo a su estado de maduración en médula ósea, identificando dos subpoblaciones de neutrófilos, denominadas Ly6G bajo y Ly6G alto, consideradas como neutrófilos inmaduros o maduros, respectivamente (Kim et al., 2017).

Conforme maduran los neutrófilos, la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4 van cambiando, ya que a través de las señales del receptor CXCR4 que reconoce a la quimiocina CXCL12, la cual es producida por las células del estroma de la médula ósea, los neutrófilos inmaduros son retenidos en la médula ósea en un estadio de reservorio mitótico y postmitótico y conforme maduran, los neutrófilos dejan de expresar CXCR4 e incrementan la expresión del receptor de quimiocina IL-8, CXCR2 (Evrard et al., 2018). Una vez que los neutrófilos ingresan a los tejidos, siguen gradientes de quimioatrayente para alcanzar los sitios de infección o inflamación. Algunos quimioatrayentes para los neutrófilos son quimiocinas, como CXCL8 (IL-8 en humanos) o CXCL1 (su análogo en ratones), CXCL2 (proteína inflamatoria de macrófagos) 2 [MIP-2] y CXCL5 (Liew & Kubes, 2019).

### **c) Mecanismos efectores de los neutrófilos**

Los neutrófilos son los primeros leucocitos en acudir a los sitios de infección o inflamación, por lo tanto constituyen una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos (Rosales et al., 2017). Es por esto que los neutrófilos cuentan con diversos mecanismos para realizar su función, entre estos mecanismos se incluyen:

- Fagocitosis (**Figura 4A**): Consiste en el reconocimiento e internalización de partículas conocidas como fagosomas, es el principal mecanismo utilizado para eliminar patógenos, es un componente fundamental responsable de la homeostasis tisular y de la respuesta inmune innata (Jaumouillé & Waterman, 2020). Los neutrófilos reconocen patógenos a

través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) o mediante opsoninas ( anticuerpos o componentes del complemento). Este proceso inicia mediante cascadas de señalización que modifican el citoesqueleto de actina e inducen cambios en los lípidos de la membrana celular para extender la membrana alrededor de la partícula y así completar la formación de una vesícula que contiene la partícula, llamada fagosoma, el cual se fusiona con vesículas derivadas del complejo de Golgi o del retículo endoplasmático y así formar un fagosoma intermediario, el cual se fusiona con vesículas endocíticas y liberará vesículas secretoras cambiando la composición de la membrana, posteriormente este fagosoma intermediario se fusionará con los lisosomas para convertirse en el fagolisosoma, una vacuola microbicida, el interior de esta es un ambiente tóxico para los patógenos (Rosales et al., 2017).

- Degranulación (**Figura 4B**): En los tres tipos de gránulos que conforman los neutrófilos, se almacenan proteínas microbicidas, los cuales son los gránulos primarios (azurófilos) que contienen mieloperoxidasa (MPO), elastasa de neutrófilo (NE), azurocidina, sialidasa, proteinasa 3, catepsina G y defensinas; los gránulos secundarios, los cuales contienen lactoferrina, lisozima, y la catelicidina LL-37 y los gránulos terciarios, que contienen metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Nauseef, 2023). En este proceso, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática, del cual se liberan de las moléculas microbicidas contenidas en los gránulos hacia el medio extracelular y cuando el neutrófilo se estimula por algún patógeno, se reclutan los gránulos hacia la membrana plasmática ocasionando la liberación de las enzimas digestivas hacia la membrana blanco (George et al., 2021).
- Especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*) (**Figura 4C**): son metabolitos químicamente reactivos del oxígeno que provienen de los subproductos del metabolismo aeróbico (George et al., 2021). Los neutrófilos sintetizan una variedad de ROS para ayudar en la eliminación y eliminación de patógenos. La producción de ROS se logra principalmente mediante la activación de la NADPH oxidasa, una enzima que cuenta con 2 subunidades (p47phox y p67phox), que requiere electrones para reducir el oxígeno a superóxido. El ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) puede entonces convertirse espontáneamente en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); ambos compuestos de ROS primarios pueden conducir a la formación de ROS secundarios a través de la enzima mieloperoxidasa de neutrófilos (MPO). Posteriormente, los neutrófilos pueden liberar estos compuestos al espacio extracelular o en el fagosoma después de la fagocitosis. Además de dañar directamente a los patógenos, las ROS también pueden aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias y reclutar otras células del sistema inmune innato en el sitio de la infección (Dahlgren et al., 2019).
- Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*) (**Figura 4D**): Los neutrófilos son capaces de sufrir una forma única de muerte celular, NETosis, que da como resultado la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Los NETs están compuestos de ADN cromosómico descondensado, histonas y proteínas granulares (como elastasa y mieloperoxidasa) capaces de atrapar y eliminar microbios extracelulares. En la NETosis, la estimulación de una variedad de mediadores

inflamatorios (por ejemplo, TNF, IL-8) y la activación de receptores tipo *Toll* (TLR) (Brinkmann et al., 2004).

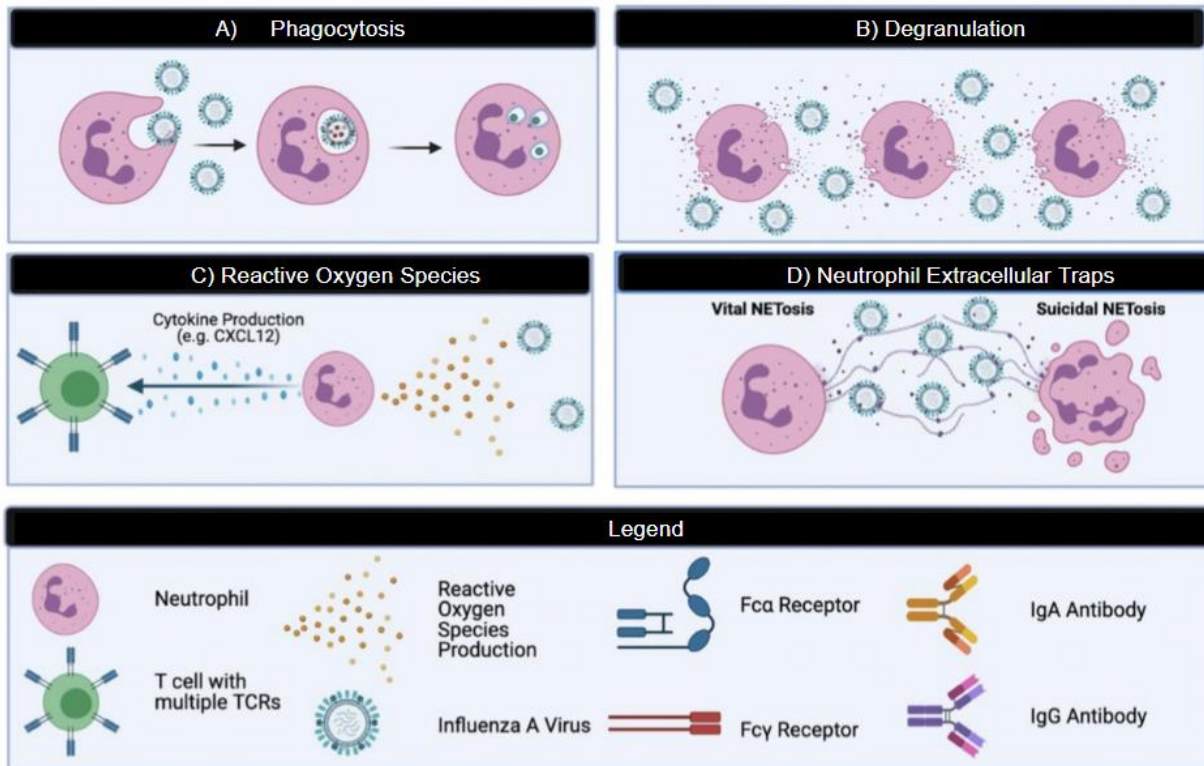


Fig 4. Mecanismos efectores de los neutrófilos (Modificado de: George et al., 2021)

#### d) Neutrófilos e infección por influenza

Aunque la mayoría de las infecciones por influenza resultan en una enfermedad leve a moderada, estas se pueden complicar en los segmentos más vulnerables de la población, estas complicaciones pueden ser pulmonares o extrapulmonares. Dentro de las complicaciones pulmonares están la neumonía, aproximadamente entre el 30% y el 40% de los pacientes hospitalizados con influenza confirmada por laboratorio son diagnosticados con neumonía aguda (Rothberg et al., 2008). La neumonía asociada a la infección por influenza primaria tiene una tasa de mortalidad de 6-29%, y aproximadamente el 25% de los pacientes con neumonía puede progresar al síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (Hu et al., 2021). Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad grave y la neumonía asociada a la infección por el virus de la influenza. Aunque hay antivirales disponibles, sólo son eficaces si el tratamiento se inicia dentro de las 48 h siguientes al inicio de los síntomas y los pacientes no suelen buscar tratamiento en este periodo de tiempo (Koonin & Patel, 2018).

La neumonía aguda y el SDRA ocasionan daño a la barrera epitelial-endotelial, ocasionando fuga de líquido hacia el lumen alveolar e insuficiencia respiratoria (Short et al., 2014), se ha observado en modelos murinos y en humanos que este reclutamiento, activación de neutrófilos y formación

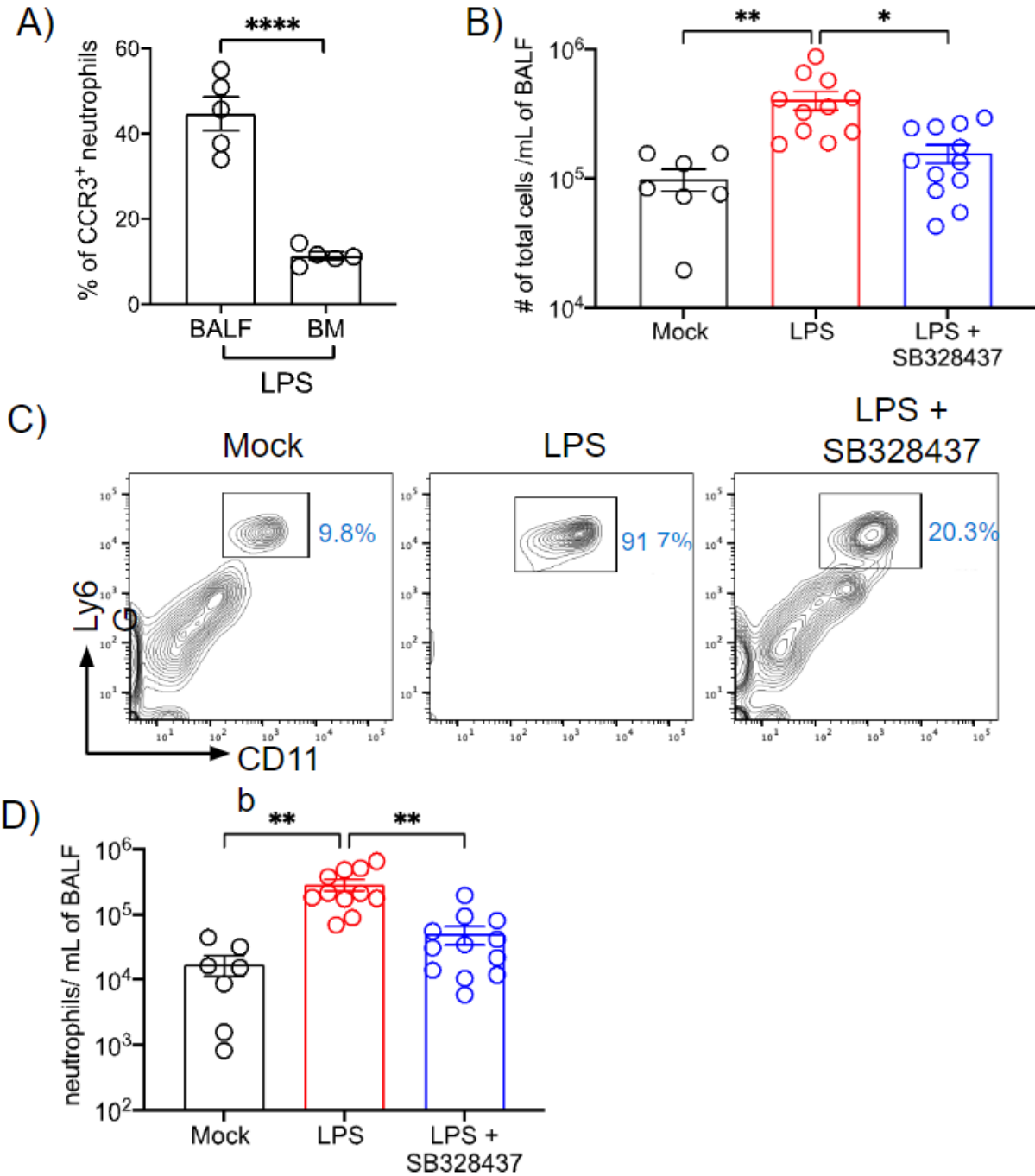
están implicados como un factor que contribuye en una enfermedad más severa y SDRA causado por influenza (Sugamata et al., 2012).

En el modelo murino se ha observado que la infección con influenza resulta en un reclutamiento exacerbado de neutrófilos y a la consecuente producción de citocinas proinflamatorias. Este reclutamiento ocurre rápidamente, pues se ha observado que el número de neutrófilos en el pulmón aumenta al doble solo 24 horas post-infección (Perrone et al., 2008). Durante la infección por influenza, los neutrófilos pueden adquirir la expresión de nuevos receptores para quimiocinas cuando son reclutados al pulmón, entre ellos: CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR3 y CXCR4. Rudd y colaboradores determinaron que el receptor CCR3 incrementa su expresión en los neutrófilos recuperados de LBA a los 4 días post infección en una infección por influenza.

En este estudio nos enfocaremos en la adquisición del receptor CCR3 (Receptor de quimiocina CC-3) en los neutrófilos durante la infección por influenza. El receptor CCR3 se expresa predominantemente en los eosinófilos, en una proporción de aproximadamente 50000 receptores por célula y se ha demostrado que es el principal receptor de quimiocinas en estas células. También se ha observado que las células Th2, los basófilos, los mastocitos, los macrófagos alveolares, las células epiteliales de las vías respiratorias, los queratinocitos y la microglía expresan CCR3 (Gong & Wilhelm, 2009). Dada la amplia expresión de CCR3 en células presentes en el tracto respiratorio durante patologías como las alergias se han evaluado diversas estrategias para bloquear a este receptor. Estas estrategias incluyen moléculas pequeñas antagonistas del receptor, anticuerpos monoclonales y oligonucleótidos antisentido (Pease & Horuk, 2014). Dentro de las moléculas pequeñas antagonistas del receptor se encuentra el compuesto SB-328437, el cual se ha utilizado como una estrategia terapéutica para el tratamiento de asma y rinitis alérgica de las vías respiratorias ya que este receptor se expresa altamente en eosinófilos.

En los neutrófilos, la estimulación ex vivo del receptor CCR3 aumenta la producción de péptidos antimicrobianos, ROS, NETS y sus actividades fagocíticas y microbicidas (Hartl et al., 2008). Nuestro grupo de trabajo ha encontrado que en condiciones inflamatorias, los neutrófilos incrementan la expresión del receptor CCR3. Por ejemplo, en el modelo de neumonía aguda inducida por *Acinetobacter baumannii* en ratón se observó que más del 50% de los neutrófilos reclutados al pulmón expresan CCR3 (Perez-Lopez et al., 2021). Por otro lado, la estimulación de CCR3 con sus ligandos CCL28 o CCL11, incrementan las actividades efectoras de los neutrófilos como la producción de ROS y NETS, así como su capacidad microbicida. Este efecto es revertido por la presencia de SB-328437 (Li et al., 2011).

Utilizando un modelo de distrés respiratorio inducido por LPS, se ha observado que los neutrófilos que son reclutados al pulmón expresan CCR3 (Fig. 4A) y que al administrar el antagonista SB-328437, el número de células totales en LBA se reduce (Fig 4B), así como el reclutamiento de neutrófilos al pulmón (Fig 4D).



**Fig. 5.** Ratones C57/BL6 fueron administrados intranasalmente 2g/kg de LPS y el grupo de control se administró con PBS. Para el grupo tratado se administró una dosis de 5 g/kg de SB-328437 vía intraperitoneal. A las 24h los ratones se sacrificaron y se determinó A) el porcentaje de neutrófilos que expresan CCR3 en el lavado broncoalveolar (LBA) y médula ósea (BM) mediante citometría de flujo, B) el número total de células por mililitro de LBA y C) la presencia de neutrófilos por mililitro de LBA. Se muestran los datos obtenidos de 2 experimentos independientes y se presentan como la media +/- SEM, cada símbolo representa un ratón. Los datos fueron analizados mediante una prueba de t de student (A) o ANOVA de una vía y se realizó la prueba pos hoc de Kruskal-Wallis (B, D). Las diferencias significativas se indican como \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

## 2. HIPÓTESIS

Los neutrófilos reclutados al pulmón de los ratones durante la infección por influenza A H1N1, expresarán el receptor CCR3 y al administrar el compuesto SB-328437, un antagonista específico para este receptor, se reducirá el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección.

## 3. JUSTIFICACIÓN

Los neutrófilos son una de las primeras líneas de defensa contra patógenos invasores, sin embargo, una activación descontrolada de estas células puede causar daño al hospedero. Un ejemplo de esto es en la infección por influenza, en la cual una complicación en casos diagnosticados con neumonía aguda aproximadamente el 25% puede progresar al síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y durante la cual, los neutrófilos juegan un papel importante en la respuesta inmune (Hu et al., 2021b).

Aunque existen terapias antivirales y vacunas para este virus, influenza sigue representando a uno de los patógenos respiratorios humanos con altas tasas de morbilidad y mortalidad, reportando mundialmente 9 millones de casos y 5,000 de muertes y para México, en la última temporada estacional 2022-2023 se registraron 7,626 casos positivos para influenza, lo cual representa una amenaza para la salud pública, y por lo tanto, es importante buscar estrategias terapéuticas para el tratamiento de las complicaciones por infecciones de influenza A.

Nuestro grupo de trabajo y otros grupos han demostrado que los neutrófilos adquieren la expresión de CCR3 durante procesos infecciosos. Además, la estimulación de este receptor incrementa las funciones efectoras de los neutrófilos, entre ellos, su capacidad microbicida, producción de ROS y NETs. Por otra parte, experimentos *in vitro* han demostrado que la presencia del compuesto SB-328437 revierte el efecto de la estimulación de CCR3 en los neutrófilos. *In vivo*, la administración de SB-328437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón en el modelo de distrés respiratorio inducido por LPS. Por lo tanto, proponemos que la administración de SB-328437 reducirá el reclutamiento de neutrófilos al pulmón y en consecuencia la inflamación durante la infección por influenza A.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar si el bloqueo del receptor CCR3 mediante el uso del antagonista específico SB-328437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A H1N1 en ratones.

### **4.2 Objetivos particulares**

- 1) Estandarizar el modelo de infección de influenza A H1N1 en ratones de la cepa C57/BL6.
- 2) Evaluar la expresión del receptor CCR3 en neutrófilos reclutados a pulmón, sangre y médula ósea de ratones de la cepa C57/BL6 infectados con influenza A H1N1
- 3) Determinar si la administración del antagonista específico de CCR3, SB-328437, tiene la capacidad de modular el reclutamiento de neutrófilos al pulmón de ratones infectados con influenza A H1N1.
- 4) Determinar si la administración del antagonista específico de CCR3, SB-328437, reduce la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en el pulmón de ratones infectados con influenza A H1N1.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Animales de experimentación**

Se seleccionaron hembras de 6 a 8 semanas de la cepa de ratones C57/BL6, los cuales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (protocolo número 1573).

### **5.2 Virus influenza H1N1**

Para los experimentos se utilizó un aislado mexicano de virus influenza A (H1N1) pdm 09 donado por el doctor Carlos Cabello Gutiérrez (Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México) (Castillejos et al., 2019).

### **5.3 Infección y tratamiento de ratones**

Los ratones se inocularon con  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de placa (UFP) en un volumen de 62.5  $\mu$ l, por vía intranasal. Los ratones tratados con SB-328437 fueron administrados con una



dosis de 5 g/kg del compuesto por vía intraperitoneal. Los ratones se agruparon de la siguiente manera:

- Grupo control: Administrados intranasalmente con PBS e intraperitonealmente con DMSO (vehículo)
- Grupo influenza: ratones administrados intranasalmente con virus influenza H1N1 e intraperitonealmente con DMSO
- Grupo influenza + SB-328437: ratones administrados intranasalmente con virus influenza H1N1 y a las 32 y 72 horas post infección administración intraperitoneal de SB-328437

A las 96 horas post-infección los ratones de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron mediante la inhalación de isoflurano y se obtuvo sangre, lavado broncoalveolar, tejido pulmonar y médula ósea para sus análisis, el cual se detalla en las siguientes secciones.

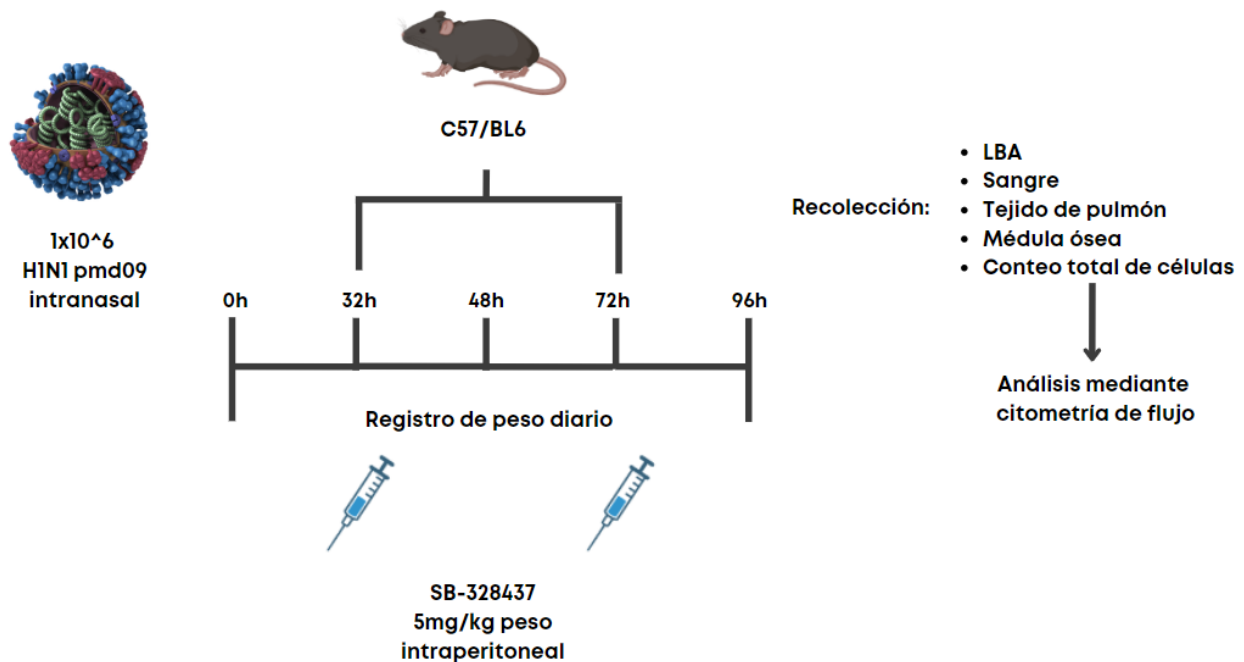


Fig 6. Esquema de infección, tratamiento y recolección de muestras

## 5.4 Recolección de muestras

### a) Sangre

Se obtuvo la sangre periférica a partir de la vena hepática, se recolectó en tubos de 1.5 mL suplementados con 5  $\mu$ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 500 mM para evitar la coagulación. Posteriormente la sangre se centrifugó a 1800 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a 4°C para separar plasma de las células; se centrifugó a 2000 rpm durante 9 min a 4°C y se recuperó el paquete

celular que corresponde a los leucocitos. Las células se lavaron con PBS (agregando 1 mL de PBS y centrifugando 2000 rpm durante 5 min a 4° C), el paquete celular se resuspendió en 100 µl de PBS y se mantuvieron a 4° C hasta su procesamiento para el análisis mediante citometría de flujo.

#### **b) Lavado broncoalveolar**

El LBA se realizó siguiendo el protocolo publicado por Van Hoecke (Van Hoecke et al., 2017). Brevemente, se realizó una incisión en la piel de los ratones para exponer y separar las glándulas salivales, se expuso la tráquea y se introdujo un catéter Punzocat (22G) el cual se aseguró usando un fragmento de hilo dental. Posteriormente se administró 0.8 mL de PBS usando una jeringa de 1mL, se realizó un masaje a los pulmones y la solución se aspiró lentamente. Esta operación se repitió este lavado 2 veces. El lavado bronqueoalveolar colectado se mantuvo a 4° hasta su procesamiento para el análisis mediante citometría de flujo.

#### **c) Obtención de suspensión celular a partir de tejido pulmonar**

Los pulmones se perfundieron con PBS hasta que ocurrió un cambio de color en el tejido a blanco, se recolectó el ventrículo derecho a un tubo Eppendorf y se cortó en fragmentos pequeños, posteriormente el tejido se transfirió a medio de cultivo RPMI suplementado con 1% SFB y 0.01% antimicótico antibiótico (adicionado con 1mg/mL colagenasa marca Sigma y 0.25mg/mL DNasa marca Sigma). El tejido se cortó y se incubó en agitación a 200 rpm durante, 1 hora a 37° C). La suspensión celular obtenida se filtró en un colador celular de 70 µm y se recuperaron mediante centrifugación (2000 rpm/ 5 min/ 4° C) y se lavaron con 1 mL de PBS. La suspensión celular se guardó a 4° C hasta su procesamiento para el análisis mediante citometría de flujo.

#### **d) Médula ósea**

Las células de médula ósea se obtuvieron a partir del fémur de los ratones. Para ello, se recuperó el fémur izquierdo, se cortaron los extremos del hueso y se introdujo 1 mL de PBS usando una jeringa con aguja calibre 25G en la luz del hueso. La suspensión celular se colectó en un tubo Eppendorf y el paquete celular se recuperó mediante centrifugación 2000 rpm, durante 5 min a 4°C). El paquete celular se resuspendió en 1mL de solución de lisis de eritrocitos y la suspensión celular se volvió a centrifugar usando las condiciones mencionadas previamente. Posteriormente se hizo un lavado con 1mL de PBS, las células se recuperaron mediante centrifugación, se suspendieron en 100µl de PBS y se mantuvieron a 4° C hasta su procesamiento para el análisis mediante citometría de flujo.

### **5.5 Cuantificación de células totales de lavado broncoalveolar**

El lavado bronqueoalveolar recolectado se centrifugó a 2000 rpm, durante 7 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante el pellet que se obtuvo al centrifugar y almacenó a -20°C, mientras que la suspensión celular se resuspendió en un volumen final de 200 µl de PBS. Con la suspensión celular obtenida se realizó una dilución 1:10 con azul tripano y utilizando una cámara de Neubauer se contabilizaron las células utilizando la siguiente fórmula: Células/ mL= Promedio células contabilizadas x 10,000 x dilución y para calcular el número de células por mililitro, se dividió entre el volumen total de LBA recolectado para cada muestra.

### 5.6 Cuantificación de proteínas totales en lavado broncoalveolar por método Bradford

Se realizó una curva de calibración utilizando las concentraciones descritas para los pozos 1 a 7 y el pozo 8 siendo el blanco (Tabla 1) y se colocaron 225 µl de las muestras de sobrenadante de LBA en los pozos restantes de una placa de 96 pozos fondo plano y se agregaron 25 µl de reactivo de Bradford, se homogeneizó y después de 5 minutos, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro BioTek. Posteriormente se graficó la absorbancia y la concentración de albúmina de suero bovino (BSA), obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar, con la cual, se traspoló la concentración de proteínas, determinando la pendiente de la recta, donde, para la ecuación:  $y=mx+b$  ;  $x=absorbancia-b/m$

Pozo	Volumen	BSA	Agua miliQ
1	20	2 mg/mL	780 µl
2	20	2 mg/mL	980 µl
3	12	2 mg/mL	788 µl
4	500	Tubo 2	500 µl
5	500	Tubo 4	500 µl
6	500	Tubo 5	500 µl
7	500	Tubo 6	500 µl
8	----	----	500 µl

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas totales en LBA

### 5.7 Tinción para citometría de flujo

A las células obtenidas de sangre, médula ósea, y LBA, se les agregaron 50 µl de solución de bloqueo (a1 µl de zombie uv Biolegend y 3 µl de trustain Biolegend por muestra) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con 500 µl de PBS y se centrifugaron durante 7 minutos a 2000 rpm a 4 grados. Después se agregaron 50 µl de la mezcla de anticuerpos y se incubó en hielo durante 30 minutos a 4°C; posteriormente se agregaron 500 µl de PBS y se centrifugaron las muestras a las mismas condiciones para agregar 250 µl de solución de fijación (Paraformaldehído al 2% en PBS) e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente; finalmente se realizó un lavado de las muestras con PBS y el pellet obtenido se resuspendió en 200µl de PBS.

<b>Antígeno</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Clona</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Marca</b>
anti-mouse CD182 (CXCR2)	APC/Cyanine7	SA044G4	Rat IgG2a, κ	Biolegend
anti-mouse CD45	PerCP/Cyanine5.5	30-F11	Rat IgG2b, κ	Biolegend
anti-mouse CD16/32	TruStain FcX™	93	Rat IgG2a, λ	Biolegend
anti-mouse Ly- 6G	FITC	1A8	Rat IgG2a, κ	Biolegend
anti- mouse/human CD11b	Pacific Blue	M1/70	Rat IgG2b, κ	Biolegend
anti-mouse CCR3	PE	83101	Rat IgG2a	R&D

**Tabla 2.** Fluoróforos utilizados para citometría de flujo.

### 5.8 Estrategia de análisis mediante citometría de flujo

Las muestras obtenidas se procesaron en un citómetro BD-Fortessa y los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Flowjo. A continuación se presenta la estrategia de análisis.

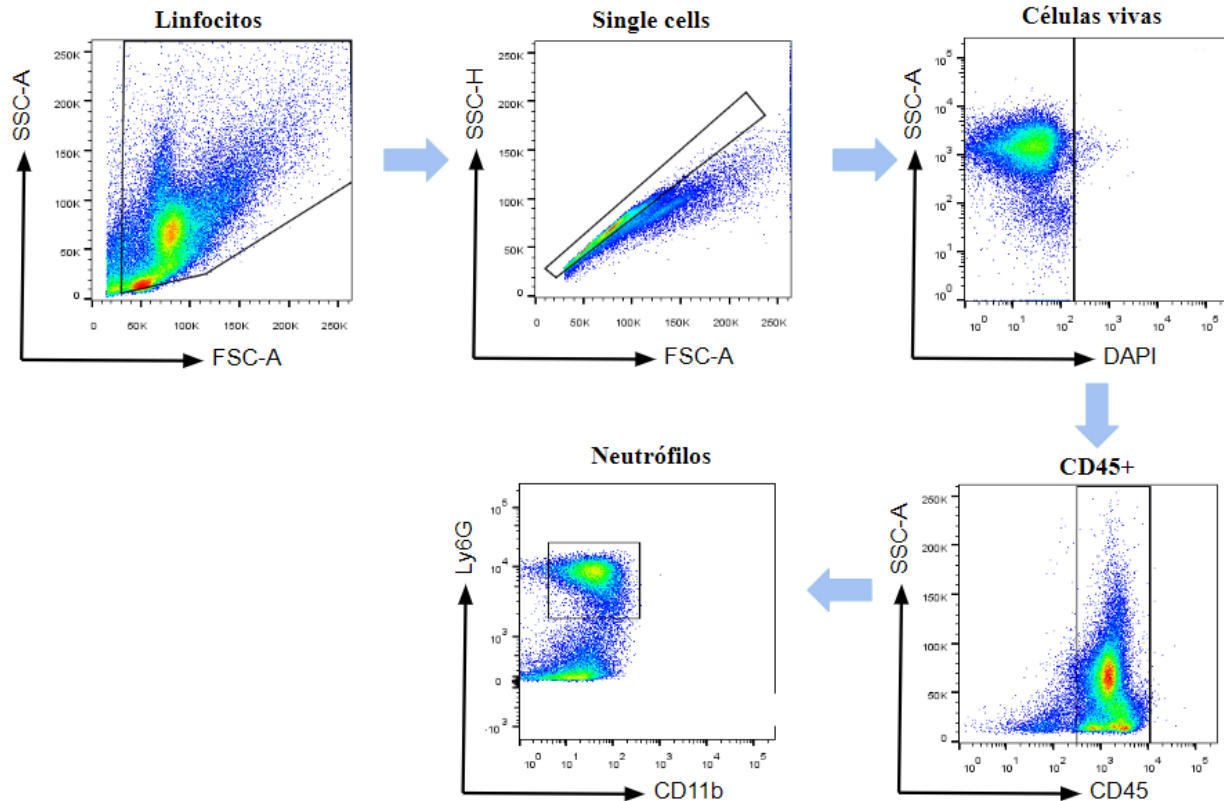


Fig 7. Estrategia de análisis mediante citometría de flujo

### 5.9 Extracción de ARN y RT-PCR

Para la extracción de ARN se trabajó en un ambiente libre de RNAsas utilizando RNAzap; se enfrió un mortero y pistilo utilizando nitrógeno líquido y se le agregó a la muestra de tejido pulmonar añadiendo poco a poco nitrógeno líquido moliendo el tejido hasta obtener un polvo fino; se transfirió a un tubo de 1.5 mL eppendorf con Trizol (Tri-reagent, Invitrogen) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 200  $\mu$ L/mL de cloroformo, se homogeneizó la muestra y se incubó por 10 minutos a TA. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4° C y la fase acuosa se recolectó en un tubo eppendorf nuevo y se mezcló con 0.5 mL de isopropanol; se incubaron a -20° C durante una hora y se centrifugó a 13000 rpm /15 min /4° C, las muestras se decantaron y se lavó el pellet de RNA añadiendo 1 mL de etanol al 75% y mezclando, se centrifugó con las mismas condiciones y se decantó de nuevo para posteriormente dejar secar las muestras. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió utilizando 10  $\mu$ L de agua libre de RNAsas.

Se realizó un tratamiento previo para eliminar el DNA de la muestra siguiendo las especificaciones de la marca ThermoScientific, en el cual se agregaron 10x de solución buffer y 1  $\mu$ L de DNasa y se incubó durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente se agregaron 0.5  $\mu$ L de EDTA y se incubó por 10 minutos a 65°C.

Con el RNA obtenido se realizó el protocolo para cDNA agregando 2 µL de Master mix , 2.5 µg de RNA y agua libre de RNAsas para llegar a un volumen final de 10 µL; las condiciones fueron las siguientes:

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Alineamiento	25	10 min	1
Retrotranscripción	50	10 min	1
Extensión	85	5 min	1

**Tabla 3.** Etapas y condiciones de retrotranscripción utilizados

Posteriormente se realizó la PCR en tiempo real, brevemente, se preparó la mezcla de reacción que incluía SYBR Green (Ampliqon), agua, el templado (cDNA) e iniciadores para los genes: *Beta actina*, *Tnfa*, *Cxcl1*, *Ccl28* y el gen que codifica para la proteína M de influenza A.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	
<i>Beta actina</i>	F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>Tnf alpha</i>	F	CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA
	R	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>Ccl28</i>	F	TGCTGTCATCCTTCATGTTAAACG
	R	TCTCTGCCATTCTTCTTTACCTCTG
	A	
<i>Cxcl1</i>	F	TGCACCCAAACCGAAGTCAT
	R	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC
Gen M virus de Influenza	F	AAGACCAATCCTGTACCTCTGA
	R	CAAAGCGTCTACGCTGAGTCC

**Tabla 4.** Secuencia de los primers utilizados para RT-PCR en tiempo real.

Las condiciones de reacción fueron:

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Activación enzimática	95	15 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	45
Alineamiento	60	30 seg	45
Extensión/Adquisición	72	30 seg	45

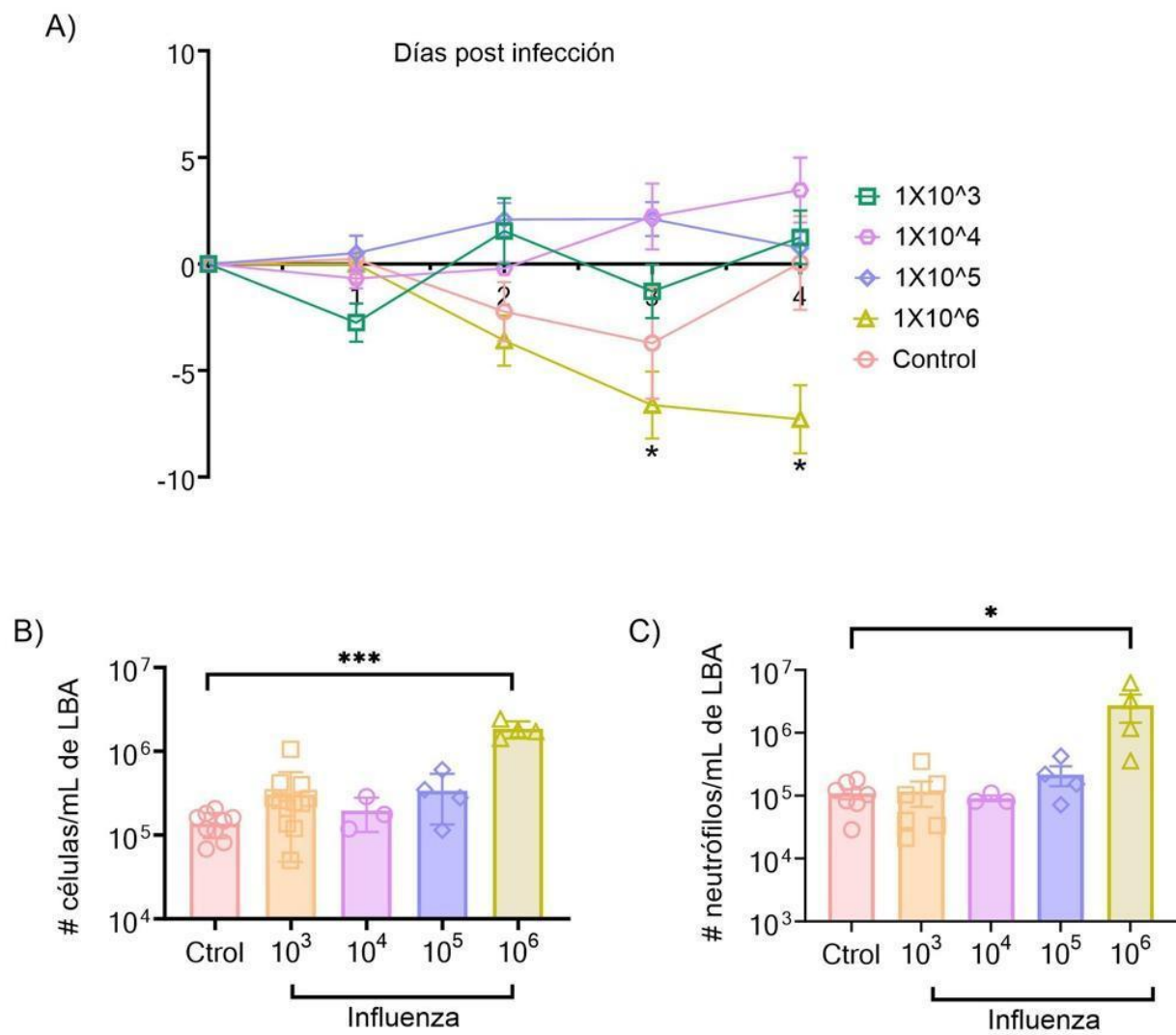
**Tabla 5.** Etapas y condiciones de RT-PCR tiempo real

Los datos se analizaron mediante el método de la  $\Delta\Delta Ct$

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Determinación de la dosis de infección de influenza H1N1 en ratones C57/BL6**

Para determinar la dosis de infección adecuada en ratones C57/BL6 se administraron intranasalmente con dosis de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFPs de virus influenza A H1N1 (pdm09). Para dar seguimiento a la infección los ratones se pesaron diariamente y se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal con las distintas dosis con respecto al peso registrado al día 0 (**figura 8A**). Para las dosis de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  UFPs no se observaron diferencias significativas con respecto al peso inicial, mientras que para la dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs se observaron diferencias significativas a los días 3 y 4 post-infección. Al día 4 post-infección, los ratones fueron sacrificados y se realizó un lavado broncoalveolar para determinar el número total de células por mililitro de LBA (**figura 8B**). Además, se determinó la presencia de neutrófilos mediante citometría de flujo para determinar la cantidad del infiltrado celular al pulmón representaban estas células (**figura 8C**), con los resultados obtenidos indican que solo cuando los ratones fueron infectados con la dosis de  $1 \times 10^6$  existe un incremento significativo en la presencia de neutrófilos de LBA. En conjunto, estos resultados nos indican que la infección con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs se induce una pérdida de peso significativa desde el día 3 post infección y un reclutamiento significativo de neutrófilos al sitio de infección a los 4dpi.



**Figura 8. Estandarización de la dosis de infección en ratones C57/BL6.** Ratones hembra C57/BL6 fueron infectados intranasalmente con  $1 \times 10^6$  UFP de influenza A H1N1 pdm09 o con PBS para el grupo de control durante 4 días. A) Los ratones se pesaron diariamente y se determinó el cambio de peso corporal en los diferentes grupos experimentales. B) Número total de células por mililitro de LBA y C) Número total de neutrófilos por mililitro de LBA. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y se realizó la prueba pos hoc de Kruskal-Wallis. Las diferencias significativas se indican como \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



## **6.2 El pico máximo de reclutamiento de neutrófilos al pulmón y expresión de CCR3 ocurre al día 4 post-infección**

Ya que los resultados obtenidos previamente indican una diferencia significativa en el número total de células por mililitro y en el número de neutrófilos respecto a los controles con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs, se utilizó esta dosis para infectar intranasalmente ratones C57/BL6 y se sacrificaron al día 4 y 7 para determinar el número total de células por mililitro de LBA (**figura 9A**), se determinó la presencia de neutrófilos mediante citometría y se calculó el número de neutrófilos por mililitro en LBA (**figura 9B**). Al día 4 post infección se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el infectado con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs para el número de células y el número de neutrófilos por mililitro de LBA. Se determinó la concentración total de proteínas en el LBA obtenido a los 4 días post-infección y se observó un incremento significativo a los 7 días post-infección (**figura 9C**).

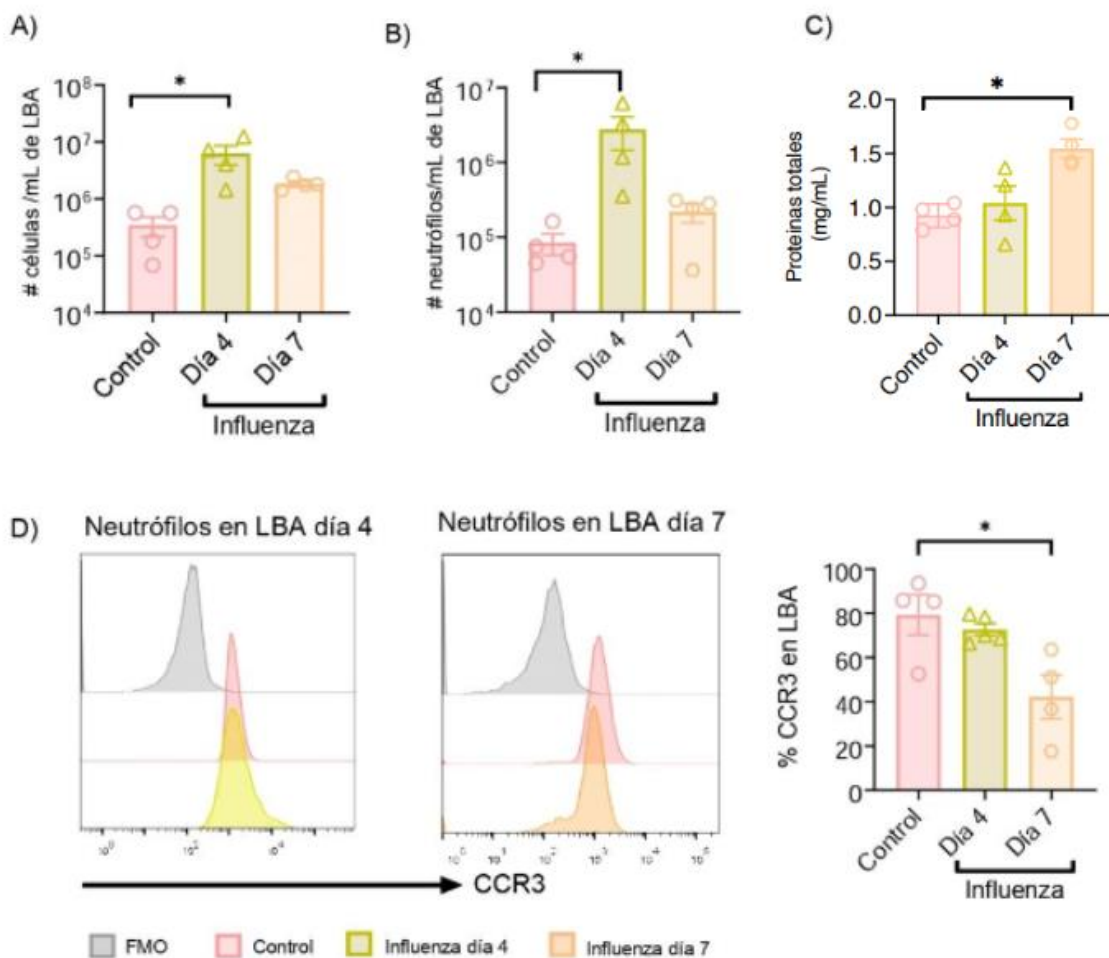
El objetivo del trabajo es determinar si el bloqueo del receptor CCR3 mediante el uso del antagonista SB-328437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A H1N1, por lo tanto, se determinó la expresión del este receptor en los neutrófilos durante la infección por influenza mediante citometría de flujo. En la **figura 9D** se muestran los histogramas representativos de los neutrófilos obtenidos del LBA a los días 4 y 7 post infección. En la **figura 9D panel derecho** se muestran los porcentajes de expresión de CCR3 en los neutrófilos. Los resultados muestran que la expresión del receptor CCR3 es mayor al día 4 que al día 7. En conjunto estos resultados nos indican que al día 4 post infección se encuentra el pico máximo de reclutamiento de neutrófilos al pulmón al igual que la expresión del receptor CCR3, por lo que se decidió utilizará una dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs y el reclutamiento de neutrófilos al pulmón se analizarán a los 4dpi en los experimentos posteriores.

## **6.3 El antagonista SB348437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A**

Nuestros resultados de estandarización del modelo de infección por influenza A en ratón mostraron que la dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs al día 4 post infección induce una pérdida de peso significativa y el pico máximo de reclutamiento de neutrófilos al pulmón a este tiempo post infección. Por lo tanto, para determinar el efecto de SB-328437 en el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza, se realizó el análisis a los 4 días post infección. Para ello, se formaron 3 grupos: el grupo control se administró con PBS intranasalmente, un grupo se infectó intranasalmente con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs virus influenza A H1N1 (pmd09) y un tercer grupo se infectó con la misma dosis de influenza ( $1 \times 10^6$  UFPs) y a las 32 y 72 horas post infección, se administró intraperitonealmente 5 g/kg de peso del compuesto SB-328437 (**Figura 6**). Se registraron los pesos diariamente para determinar el porcentaje de cambio de peso corporal y se sacrificaron al 4 dpi. La **figura 10A** presenta el porcentaje de cambio de peso corporal de los ratones infectados respecto al peso registrado al día 0, en el cual se observó que tanto los ratones infectados con influenza y el grupo tratado con el antagonista tuvieron una reducción en el porcentaje de peso corporal respecto al grupo control. Al cuantificar el número

total de células en LBA observamos un incremento en la concentración de células totales en el LBA del el grupo infectado con influenza con respecto al grupo control (**figura 10B**), sin embargo, cuando los ratones fueron tratados con SB-328437, la concentración de células totales se redujo significativamente.

Posteriormente se determinó la presencia de neutrófilos en el LBA. El análisis de las células mediante citometría de flujo reveló que el porcentaje de neutrófilos en LBA incrementa en el grupo infectado con influenza A (90.7%), en comparación con el grupo control (40.1%) y este disminuye en el grupo tratado con SB-328437 (62.1%) (**figura 10C, panel izquierdo**). Al determinar el número de neutrófilos por mililitro del LBA se encontraron diferencias significativas entre el grupo control e influenza y los tratados con el antagonista y el grupo influenza (**figura 10C, panel derecho**)



**Figura 9. Determinación del pico máximo de reclutamiento de neutrófilos y expresión de CCR3 en pulmón.**

Ratones C57/BL6 fueron infectados intranasalmente con  $1 \times 10^6$  PFU influenza A H1N1 pmd09 o administrados con PBS para el grupo de control. A los 4 o 7 días post-infección se determinó: A) Número total de células por mililitro de LBA y B) Número total de neutrófilos por mililitro de LBA C) Cuantificación de proteínas totales (mg/ml) en LBA a los 4 y 7 días post-infección. D) Los neutrófilos de LBA fueron analizados mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CCR3, se muestran los histogramas representativos de la expresión de CCR3 (panel izquierdo) y su cuantificación (panel derecho). Se muestran los datos obtenidos de 2 experimentos independientes y se presentan

como la media +/- SEM, cada símbolo representa un ratón. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y se realizó la prueba pos hoc de Kruskal-Wallis. Las diferencias significativas se indican como \*  $p < 0.05$ .

En la **figura 10D, panel izquierdo** se observan los dot plots representativos de los neutrófilos reclutados al pulmón durante infección por influenza y en el panel derecho, el porcentaje de neutrófilos reclutados al pulmón, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (**figura 10 D, panel derecho**). Resultados similares se obtuvieron al analizar los neutrófilos presentes en sangre (**figura 10 E panel izquierdo**) y en médula ósea (**figura 10 F panel izquierdo**), ya que al analizar los porcentajes de los tres grupos experimentales no existen diferencias significativas (**figura 10 E y F, paneles derechos**).

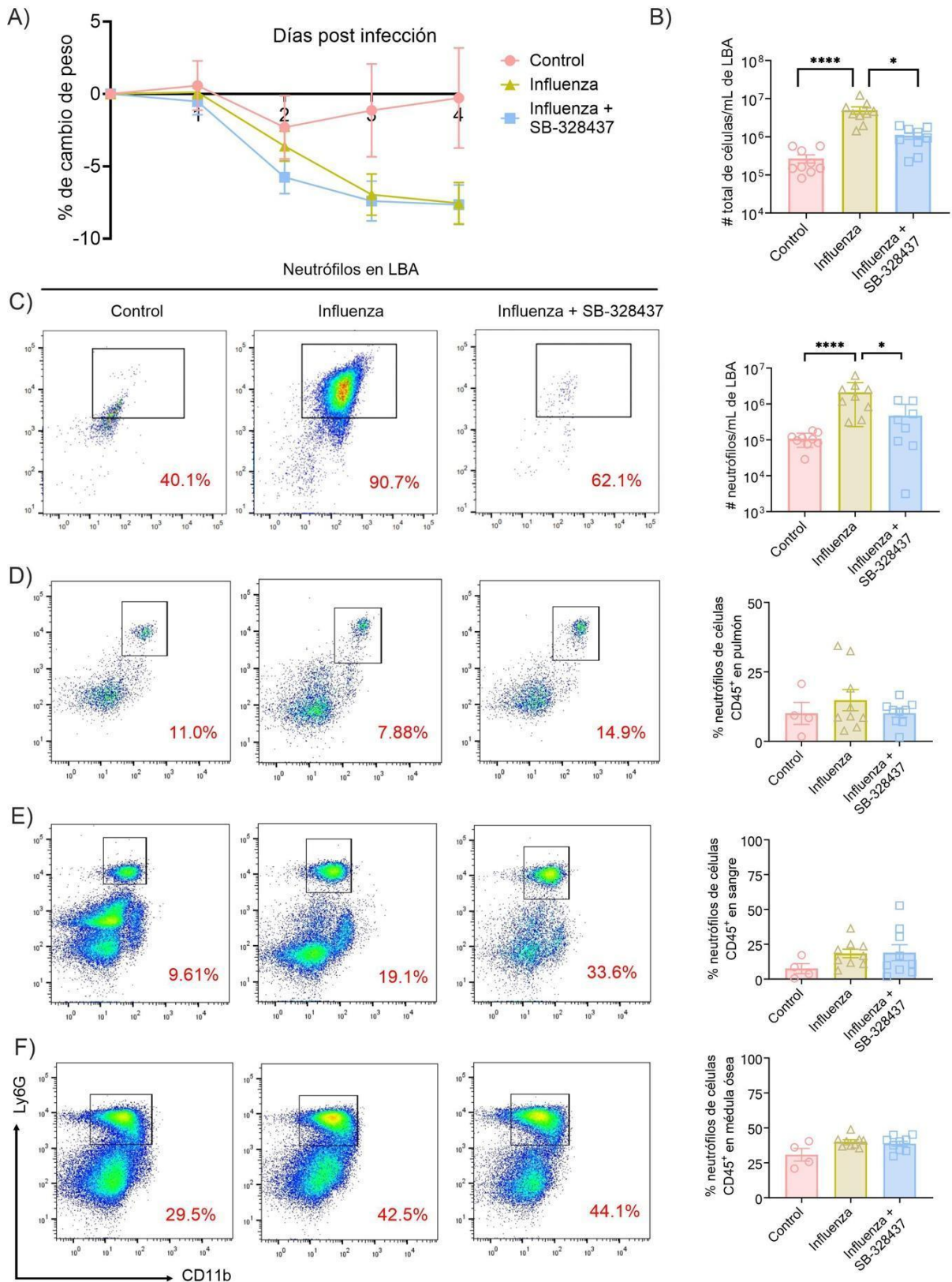
Todos estos datos en conjunto muestran que la administración del antagonista SB-328437 con una dosis de 5 g/kg en ratones C57/BL6 infectados con influenza A H1N1 a las 32 y 72 horas post infección reduce significativamente el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón a los 4dpi, mientras que no se observan cambios significativos en sangre y médula ósea.

### **6.3 La administración del antagonista SB-328437 no afecta la expresión de los receptores CCR3 y CXCR2 en neutrófilos.**

Dado que el antagonista SB-328437 es específico para el receptor CCR3, evaluamos si este antagonista tenía efecto en la expresión de CCR3 o de CXCR2. Este último está involucrado en la movilización de los neutrófilos desde la médula ósea hacia el sitio de infección. Para esto, se analizaron las muestras recuperadas de LBA a los 4 días post infección de sangre periférica, médula ósea y tejido pulmonar mediante citometría de flujo de los 3 grupos experimentales (**figura 6**). En cuanto a la expresión de CCR3, observamos que la mayoría de los neutrófilos obtenidos a partir de LBA y sangre expresan este receptor sin diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (**figura 11, paneles A y C**). Los niveles de expresión de CCR3 son menores en los neutrófilos obtenidos de médula ósea y del parénquima del pulmón, sin que exista diferencia significativa entre los diferentes grupos experimentales. Aproximadamente, entre el 2-8% de los neutrófilos expresan CCR3 en la médula ósea (**figura 11, panel E**) y en promedio, entre 30-40% de los neutrófilos localizados en el parénquima pulmonar expresan este receptor (**figura 11, panel G**).

Cuando analizamos la expresión de CXCR2, encontramos que los niveles de expresión de este receptor fueron similares en los neutrófilos provenientes de LBA, sangre y médula ósea de todos los grupos experimentales (**figura 11, paneles B, D y F**). Se excluyó el análisis del receptor CXCR2 en pulmón ya que, al realizar la digestión enzimática para recuperar las células de tejido pulmonar, descrito en la metodología, se pierde la expresión de este receptor.

En conjunto, estos resultados demuestran que al administrar el antagonista SB-328437 en un modelo de infección por influenza A no afecta a la expresión de los receptores CCR3 y CXCR2 en los neutrófilos reclutados al pulmón. Por lo que es posible que el antagonista al unirse con el receptor esté impidiendo que se unan sus ligandos y por consiguiente esto impide que se puedan desencadenar las vías de señalización.



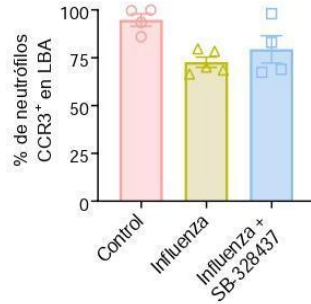
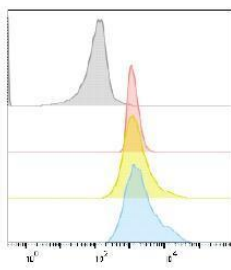
**Figura 10. Administración del compuesto SB-328437 durante infección por Influenza A H1N1 en ratones C57/BL6.** Ratones C57/BL6 fueron infectados intranasalmente con  $1 \times 10^6$  PFU de influenza A-H1N1 pmd09 y el grupo de control se administró con PBS. Para el grupo tratado se administró una dosis de 5 g/kg de SB-328437 vía intraperitoneal a las 32 y 72 horas. A) Los ratones se pesaron diariamente y se muestra el porcentaje de cambio de peso a los 1-4 días post infección. A los 4 días post-infección se determinó: B) el número total de células por mililitro de LBA y C) la presencia de neutrófilos se analizó mediante citometría de flujo en LBA (C), pulmón (D), sangre (E) y médula ósea (F). Se muestran los dot plots representativos para las muestras colectadas (C-F panel izquierdo), la cuantificación de neutrófilos por mL de LBA (C, panel derecho) y el porcentaje de neutrófilos de células CD45+ (D-F, panel derecho). Se muestran los datos obtenidos de 2 experimentos independientes y se presentan como la media  $\pm$  SEM, cada símbolo representa un ratón. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y se realizó la prueba pos hoc de Kruskal-Wallis. Las diferencias significativas se indican como \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **6.5 La administración del antagonista SB-328437 reduce la expresión de citocinas inflamatorias y puede reducir la carga viral durante la infección por influenza A**

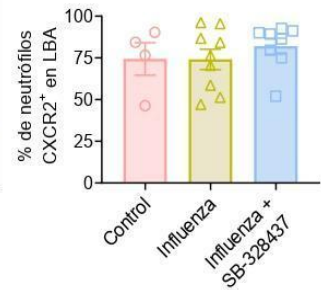
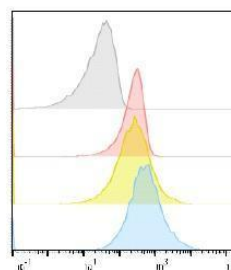
Como resultado del reclutamiento de neutrófilos a el pulmón se promueve la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y a su vez, esto amplifica la respuesta inflamatoria en el tejido (Zemans & Matthay, 2017). Nuestros resultados indican que al administrar SB-328437 se reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante una infección por influenza (**Fig. 10**). Por lo tanto, evaluamos la expresión de algunos mediadores pro-inflamatorios, incluyendo: *Ccl28*, ligando de CCR3 (Pan et al., 2000), el factor de necrosis tumoral alfa (*Tnfa*), una citocina pro-inflamatoria (Yamazaki, 1994) y la quimiocina *Cxcl1*, involucrada en el reclutamiento de los neutrófilos al sitio de infección (De Filippo et al., 2013). Esta evaluación se realizó mediante RT-PCR en tiempo real y los resultados se expresan como veces de incremento de la expresión con respecto al grupo control. En la **figura 12 A** observamos que los niveles de expresión de *Ccl28* son similares en el tejido pulmonar de los ratones infectados con influenza y aquellos que fueron infectados con influenza y tratados con SB-328437 (**figura 12A, panel izquierdo**). Con respecto a la expresión de *Tnfa*, encontramos que el tratamiento con SB-328437 reduce la expresión de esta citocina en el tejido pulmonar (**figura 12A, panel intermedio**). Cuando evaluamos la expresión de *Cxcl1* observamos una tendencia en la reducción de la expresión de esta quimiocina pulmón durante la infección por influenza en el grupo al cual se le administró SB-328437 (**figura 12A, panel derecho**). Estos resultados sugieren que la administración de SB-328437 durante la infección por influenza reduce la expresión de citocinas proinflamatorias.

Por último, para determinar si la administración del antagonista tenía algún efecto sobre la carga viral, se determinó la expresión del gen que codifica para la proteína de matriz (M) de influenza A mediante RT-PCR. Nuestros resultados indican que los ratones infectados con influenza y tratados con el compuesto SB-328437 muestran niveles de expresión del gen M menores que el grupo de ratones que solo fueron infectados con influenza (**figura 12B**). Estos hallazgos sugieren que la administración del compuesto SB-328437 podría tener un impacto en la carga viral de forma indirecta.

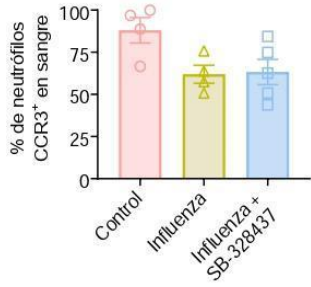
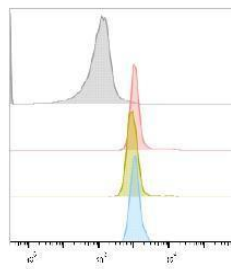
A) **Neutrófilos en LBA**



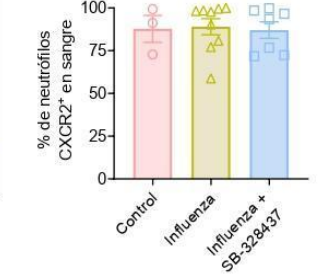
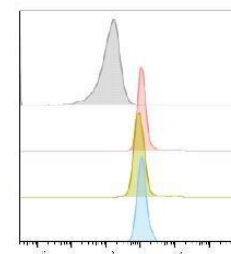
B) **Neutrófilos en LBA**



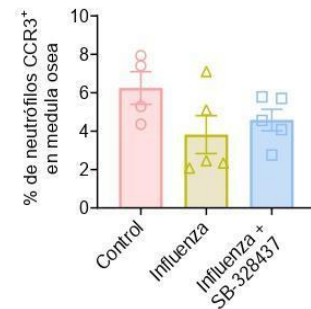
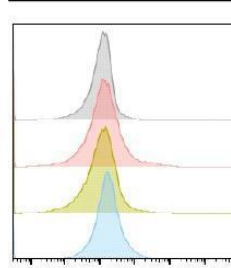
C) **Neutrófilos en sangre**



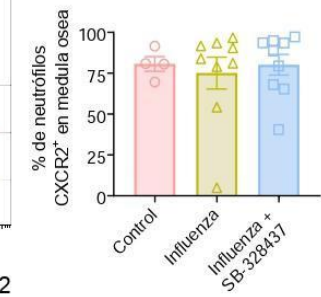
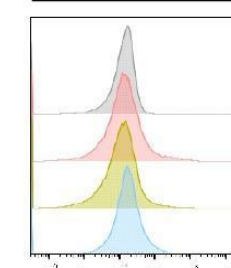
D) **Neutrófilos en sangre**



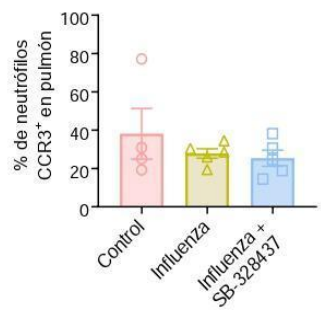
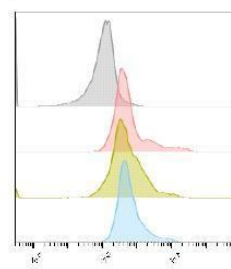
E) **Neutrófilos en médula osea**



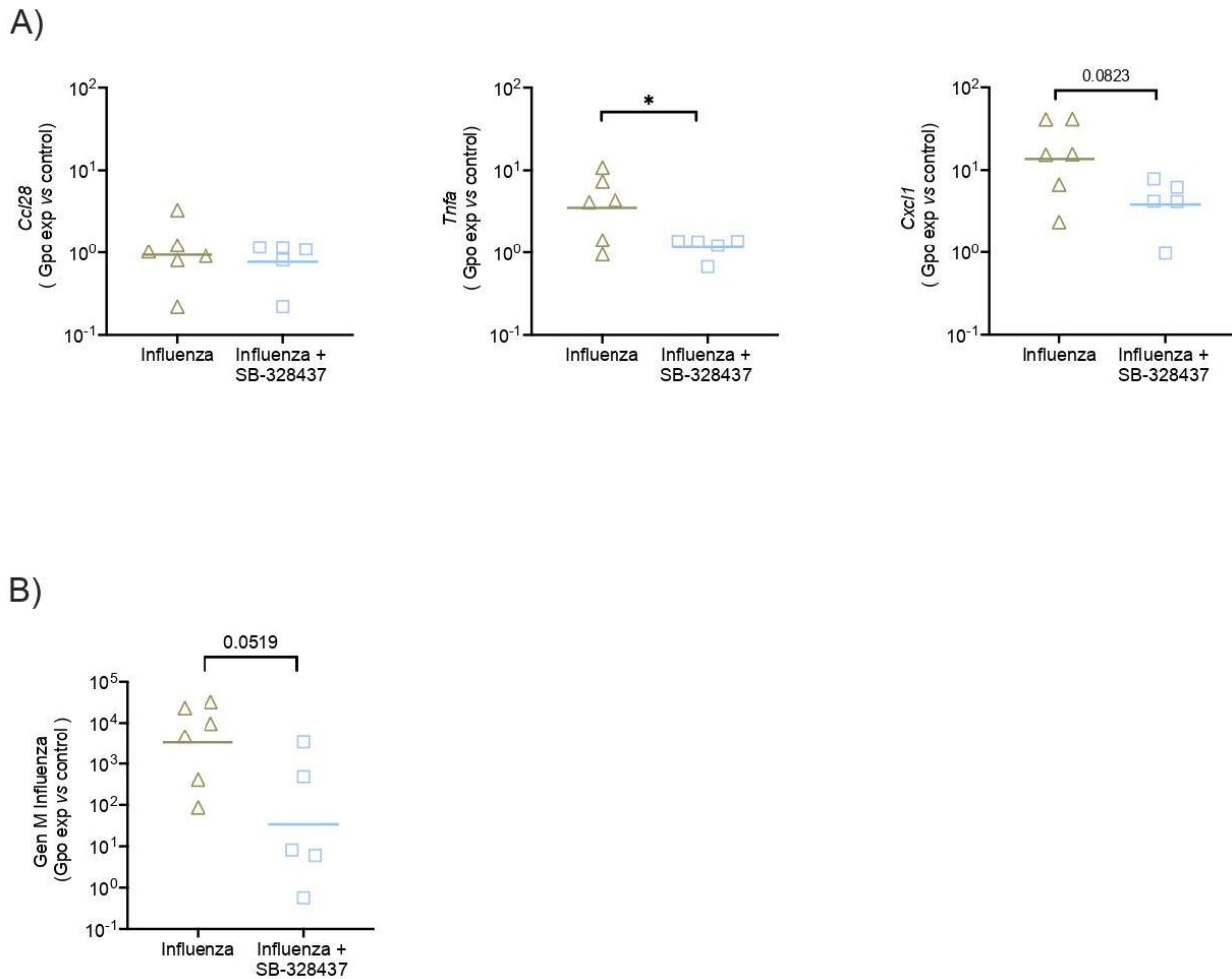
F) **Neutrófilos en médula osea**



G) **Neutrófilos en pulmón**



**Figura 11. Expresión de los receptores CCR3 y CXCR2 al día 4 post infección.** Ratones C57/BL6 fueron infectados intranasalmente con  $1 \times 10^6$  PFU de influenza A H1N1 pdm09 y el grupo de control se administró con PBS. Para el grupo tratado se administró una dosis de 5 g/kg de SB-328437 vía intraperitoneal a las 32 y 72 horas. A los 4 días post infección y mediante citometría de flujo se determinó: A) El porcentaje de neutrófilos CCR3+ en LBA, C) sangre, E) médula ósea, G) pulmón. Y el porcentaje de neutrófilos CXCR2+ en B) LBA, D) sangre, F) médula ósea. Se muestran los histogramas representativos para las muestras colectadas (A-G panel izquierdo). Se muestran los datos obtenidos de 2 experimentos independientes y se presentan como la media  $\pm$  SEM, cada símbolo representa un ratón. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y se realizó la prueba pos hoc de Kruskal-Wallis.



**Figura 12. Expresión de citocinas proinflamatorias a los 4 días post infección.** Ratones C57/BL6 fueron infectados intranasalmente con  $1 \times 10^6$  PFU de influenza A H1N1 pdm09 y el grupo tratado se administró una dosis de 5 g/kg de SB-328437 vía intraperitoneal a las 32 y 72 horas. Al día 4 post infección se recolectó una muestra del lóbulo derecho del pulmón de los ratones y se realizó una RT-PCR en tiempo real para los genes: *Ccl28*, *Tnfa*, *Cxcl1* (A) y el gen que codifica para la proteína M de influenza A (B). Los resultados se analizaron mediante el método de la  $\Delta\Delta Ct$ .

## 7. DISCUSIÓN

El virus de influenza A representa una problemática de salud mundial debido a la aparición de variantes con mayor capacidad de transmisión humana y mayor patología (Flerlage et al., 2021). La variante del virus de influenza A H1N1 (pdm09) surge a partir de la pandemia en el año 2009 que afectó entre otros países a México y que presentó una mayor tasa de transmisión y una severidad moderada a grave en comparación con virus de influenza estacionales. Dentro de las complicaciones que se observaron en estos pacientes se encuentra el desarrollo de SDRA, el cual se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada en la que los neutrófilos juegan un papel central (Hu et al., 2021b). Si bien los neutrófilos representan una de las primeras líneas de defensa del sistema inmune contra patógenos invasores, su activación descontrolada puede ocasionar daño al hospedero (Zemans & Matthay, 2017).

Los neutrófilos expresan los receptores CXCR1 y CXCR2, los cuales participan en el reclutamiento de estos a los sitios de infección, sin embargo, se ha demostrado que en condiciones inflamatorias, los neutrófilos adquieren la expresión de receptores de quimiocinas, entre ellos CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3, y CXCR4 en la superficie y su activación puede amplificar los mecanismos efectores de los neutrófilos (Hartl et al., 2008; Rudd et al., 2019).

Nuestros experimentos de estandarización indicaron que a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFPs de virus de influenza A (pdm09) los ratones pierden un porcentaje significativo de peso desde el día 3 post-infección y continuo a la baja al día 4 post-infección, lo cual es un indicativo de enfermedad (**figura 8A**). Estos resultados son similares a los reportados por Einfeld *et al* en 2019, en los cuales se observa una tendencia a reducción en el peso en ratones C57/BL6 utilizando una dosis de  $1 \times 10^6$  UFP de virus influenza A H1N1. Adicionalmente, se analizó el LBA de los ratones infectados con las diferentes dosis a los 4 días post-infección para determinar el número total de células y la presencia de neutrófilos. Los resultados indican que solo cuando los ratones se infectaron con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFP hay un incremento significativo en el número de células totales y presencia de neutrófilos en el LBA con respecto a los ratones del grupo control (**figura 8A-C**). El incremento significativo de células totales y neutrófilos en el LBA usando la dosis de infección de  $1 \times 10^6$  UFP se correlaciona de manera positiva con la pérdida significativa de peso usando esta misma dosis. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rudd *et al* en 2019, en el cual se encontró un incremento en el número total de células en LBA y neutrófilos al día 4 post infección.

En el modelo de infección de influenza en ratones, los neutrófilos comienzan a ser reclutados al pulmón desde el día uno post-infección y la presencia de estas células se en el tejido pulmonar se extiende hasta los días 5-7 post-infección, dándose el pico máximo de reclutamiento entre los días 3-6 post-infección (Rudd et al., 2019). Cuando evaluamos la presencia de neutrófilos en el LBA a los días 4 y 7 post-infección, encontramos que al día 4 hay un incremento significativo de neutrófilos en el LBA con respecto al grupo control y se reduce al día 7 post infección (**figura 9B**). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado previamente en el modelo de infección de influenza en ratón.



Un marcador de daño pulmonar es el incremento de la concentración de proteínas en el LBA (Suliman et al., 2001). En el caso del modelo de infección de influenza en ratón, se puede observar un incremento en la concentración de proteínas totales en el LBA desde el día 3 post-infección y hay incrementos significativos a partir del día 5 post-infección (Ferreira et al., 2023; Suliman et al., 2001). En nuestro caso, observamos un incremento significativo en la concentración total de proteínas al día 7 post-infección, indicando que hay daño tisular (**figura 9C**).

Por otra parte, se ha demostrado que los neutrófilos reclutados en la mucosa intestinal o pulmonar durante procesos infecciosos adquieren la expresión del receptor CCR3 (Perez-Lopez et al., 2021; Rudd et al., 2019). En línea con estos reportes, nuestros resultados muestran que la mayoría de los neutrófilos obtenidos de LBA expresan el receptor CCR3 al día 4 post-infección y este porcentaje tiende a reducirse a los 7 días post-infección. Además, los pocos neutrófilos recuperados del LBA de los ratones del grupo control también expresan CCR3. Por lo tanto, la expresión de CCR3 se da en la mayoría de los neutrófilos que se translocan al espacio alveolar y en el caso de la infección por influenza, esto ocurre principalmente al día 4 post-infección. En conjunto, los resultados indican que fuimos capaces de replicar el modelo de infección por influenza en ratones C57/BL6, ya que obtuvimos parámetros como la pérdida de peso, número de células totales por mL de LBA, número de neutrófilos por mL de LBA.

Para comparar si el pico máximo de expresión y reclutamiento de neutrófilos ocurría al día 4 o 7, se comenzó infectando ratones C57/BL6 intranasalmente con dosis de  $1 \times 10^6$  UFP y sacrificados al día 4 y 7 post infección, posteriormente se determinó el número total de células por mililitro de LBA (**figura 9A**) y la cantidad de neutrófilos por mililitro en este lavado bronquioalveolar (**figura 9B**), en los cuales se obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo control en día 4 post infección, estos resultados se asemejan con lo reportado por Rudd *et al* en 2019 ya que a pesar de que trabajan con una variante distinta del virus de influenza A, encontraron que existía un número de células totales en LBA a los 4dpi, al igual que los resultados obtenidos, encontramos que el reclutamiento de células es significativo a partir del 4dpi y se mantiene elevado hasta los 7 dpi, sin embargo el pico máximo se encuentra a los 4 días.

Como un indicador de inflamación en el pulmón se cuantificó la concentración total de proteínas (**figura 9C**) en la cual se encontraron diferencias significativas respecto al control utilizado hasta el día 7 post infección, resultado que va en línea con lo reportado por Suliman et al en 2001, en donde una cuantificación en el incremento de proteínas totales en LBA es un indicador del alcance del daño pulmonar agudo provocado por una infección de influenza A, en el cual se encontró un aumento en las proteínas totales en grupos infectados encontrando diferencias significativas a los 5 dpi y un aumento aún más evidente a los 7 dpi, por lo tanto esto sugiere que el daño pulmonar agudo en pulmones infectados con influenza A presenta un pico máximo a los 7 días post infección y es por lo que se decidió no realizar esta cuantificación en los experimentos posteriores, sin embargo en futuros experimentos sería importante realizar un seguimiento y comparar los resultados que se obtengan.

Reportes previos han demostrado que los neutrófilos reclutados a la mucosa adquieren la expresión de CCR3. Por ejemplo, durante la infección por *Salmonella*, los neutrófilos presentes en la mucosa intestinal expresan CCR3 (Perez-Lopez et al., 2021). Por otro lado, los neutrófilos

reclutados al pulmón durante la infección por *Acinetobacter baumannii* o COPD, también expresan CCR3 (Perez-Lopez et al., 2021). Nuestros resultados muestran que los pocos neutrófilos presentes en el pulmón de los ratones del grupo control también expresan CCR3, los niveles de expresión se mantienen a los 4 días post-infección y los niveles se reducen al día 7 post-infección (**figura 9D**). Estos hallazgos están en línea con lo reportado previamente, en donde la máxima expresión de CCR3 en los neutrófilos recuperados de BAL durante la infección por influenza se encontraron entre el día 4 y 5 post-infección (Rudd et al., 2019). En conjunto, nuestros datos y los reportes previos demuestran que la expresión de CCR3 en los neutrófilos reclutados a la mucosa durante procesos inflamatorios, infecciones agudas o inflamación crónica, es un fenómeno generalizado.

Nuestro grupo de trabajo y otros han encontrado que la estimulación de CCR3 puede incrementar el estado de activación de los neutrófilos. De hecho, experimentos *in vitro* han demostrado que la presencia de la molécula SB-328437, un antagonista específico para CCR3, revierte el efecto de CCL28. *In vivo*, hemos observado que en el modelo de distrés respiratorio inducido por LPS, la administración de SB-328437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón.

Una de las complicaciones de la infección por influenza A es la inducción de inflamación exacerbada con el consecuente desarrollo de SDRA. En el SDRA, la activación aberrante de los neutrófilos tiene un papel importante en el daño a la barrera epitelial y endotelial al pulmón (Perrone et al., 2008). Estos son reclutados a las 24 horas post infección y producen ROS, citocinas proinflamatorias y NET's, lo cual resulta en daño a la barrera epitelial-endotelial (Short et al., 2014). Se ha observado que la acumulación de neutrófilos en el pulmón se correlaciona positivamente en la severidad de pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (Weiland et al., 1986).

Por lo tanto, evaluamos si la administración del antagonista de CCR3 durante la infección por influenza A podría tener algún efecto sobre la inflamación pulmonar. Nuestros resultados demuestran que el pico máximo de reclutamiento de neutrófilos y expresión de CCR3 en estas células se da al día 4 post-infección usando una dosis de  $1 \times 10^6$  UFP. Los resultados indican que tanto los ratones infectados con influenza, como los infectados y tratados con el antagonista muestran cinéticas similares en la pérdida de peso (**figura 10A**). Se ha determinado que en modelos murinos durante infecciones por influenza presentan una pérdida de peso de más del 30% antes de comenzar a recuperarse (Felgenhauer et al., 2020). En este sentido, se podría realizar un seguimiento más largo de la infección para poder determinar si la administración del antagonista podría tener un efecto sobre este parámetro a periodos más largos post-infección.

Nuestros resultados previos indicaron que el pico máximo de reclutamiento de neutrófilos es a los 4 días post-infección, por lo tanto, decidimos analizar el efecto de la administración del antagonista de CCR3 en el reclutamiento de neutrófilos a este tiempo. Encontramos que hay una disminución de células totales y neutrófilos en LBA en el grupo infectado y tratado con SB-328437 en comparación con el grupo que solo fue infectado (**figura 10B y C**). Estos hallazgos concuerdan con lo observado por nuestro trabajo y con el reporte de Lee, en donde la administración de este compuesto reduce la presencia de neutrófilos en el BAL en el modelo de SDRA inducido por LPS (**Fig 5C y D**). Además, existen otros modelos de otras patologías donde se ha empleado la administración de SB-328437 para reducir la inflamación. Por ejemplo, la

administración de este antagonista de CCR3 reduce la neovascularización en el modelo de inducción de neovascularización por daño alcalino (Zhou et al., 2012). También se ha observado una reducción en infiltrado eosinofílico en el modelo de colitis inducida por TNBS cuando los animales son administrados con SB-328437 (Filippone et al., 2022). Todos estos hallazgos demuestran que el receptor CCR3 puede ser empleado como un blanco terapéutico en aquellas patologías en las que la inflamación juega un papel central, incluyendo las complicaciones durante la infección por influenza A.

Por otra parte, observamos que no hay diferencias significativas en las células obtenidas de tejido pulmonar, en sangre periférica y en médula ósea entre los 3 grupos experimentales (**figura 10 D-F**). Estos datos sugieren la administración de SB-328437 durante la infección por influenza afecta exclusivamente la translocación de los neutrófilos al espacio alveolar, sin que este altere la generación de neutrófilos en médula ósea, su egreso a sangre periférica o su llegada al parénquima pulmonar. Nuestro grupo de trabajo encontró que la administración de SB-328437 no tiene efecto en la frecuencia de neutrófilos en médula ósea, sin embargo, observó una tendencia de reducción de neutrófilos en sangre periférica en el grupo tratado con el antagonista de CCR3. Por otra parte, cuando se administró el compuesto SB-328437 en el modelo de colitis inducida por TNBS se observó una reducción de la presencia de eosinófilos en sangre periférica. Estos hallazgos contrastan con nuestros hallazgos en sangre periférica durante la infección por influenza A, una posibilidad es que los efectos de la administración del antagonista sobre células en la periferia dependan del origen de la inflamación. Alternativamente, podríamos evaluar el efecto de la administración del antagonista de CCR3 sobre los neutrófilos de sangre periférica durante la infección por influenza a tiempos más tempranos y/o tardíos de los evaluados en este trabajo.

Los resultados obtenidos indican que la administración del antagonista durante infección por influenza A no afecta la expresión de los receptores CCR3 ni CXCR2 (**figura 11**), por lo que, al unirse SB-328437 a CCR3 impide la unión de sus ligandos (CCL28, CCL11, CCL24, CCL26), esto impide que se desencadenen las vías de señalización como quimiotaxis, degranulación, la producción de ROS o NET's.

El reclutamiento e infiltración de neutrófilos hacia el pulmón durante la infección por influenza A promueve la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuales amplifican la inflamación en el tejido (Camp & Jonsson, 2017). Nuestros resultados mostraron que hay una reducción en el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza cuando fueron tratados con el antagonista de CCR3 (**figura 10**). En línea con estos resultados encontramos que hay una disminución en la expresión de *Tnfa* y *Cxcl1* en los ratones infectados con influenza A que fueron tratados con el compuesto SB-328437 en comparación con aquellos que solo fueron infectados (**figura 12**). TNFa es una citocina proinflamatoria, la cual ha sido asociada con la morbilidad y mortalidad en infecciones severas por influenza (Horiuchi et al., 2010), ya que una infiltración de neutrófilos al pulmón durante la infección viral promueve la producción de esta citocina y a la vez esto amplifica la respuesta inflamatoria en el tejido (Zemans & Matthay, 2017) . Por otra parte, CXCL1 actúa principalmente como quimioatrayente para los neutrófilos y desempeña un papel crucial en el reclutamiento de estas células a sitios de inflamación o lesión tisular.

Estudios previos han demostrado que la inhibición de la autofagia reduce la inflamación y la replicación viral (Sun et al., 2012), estos datos sugieren que existe una relación bidireccional entre la inflamación y la replicación viral. Cuando evaluamos la carga viral a través de la expresión del gen M de influenza (**figura 12**), encontramos un nivel menor de expresión del gen M de influenza en los ratones infectados y tratados con SB-328437 fueron menores que en el grupo experimental que solo fue infectado con influenza. No consideramos que el antagonista de CCR3 tenga un efecto antiviral directo. Una posibilidad es que el haber reducción de daño tisular por la administración de SB-328437 se limite la replicación viral, alternativamente, al limitar la respuesta mediada por citocinas proinflamatorias se podría favorecer la producción de interferones tipo I, los cuales son centrales en la respuesta antiviral (Wu & Metcalf, 2020).

## 8. CONCLUSIONES

- 1) El pico máximo de reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A se da alrededor del día 4 post-infección.
- 2) La mayoría de los neutrófilos reclutados al pulmón durante la infección por influenza A expresan CCR3 al día 4 post-infección.
- 3) La administración de compuesto SB-328437 reduce el reclutamiento de neutrófilos al pulmón durante la infección por influenza A.
- 4) La administración del antagonista de CCR3 reduce la expresión de *Tnfa* y *Cxcl1* durante la infección por influenza A.
- 5) Los ratones tratados con SB-328437 muestran una menor expresión del gen M de la influenza, lo que sugiere una reducción en la carga viral.

## 9. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar los efectos del compuesto SB-328437 a tiempos más tempranos y tardíos post-infección.
- 2) Determinar si el tratamiento con el antagonista de CCR3 reduce la producción de TNFa y CXCL1 nivel de proteína.
- 3) Corroborar los niveles de carga viral determinando las unidades formadoras de placa.
- 4) Determinar si la administración de SB-328437 favorece la producción de interferones tipo I durante la infección por influenza.

## 10. REFERENCIAS

- Arbeitskreis Blut, Untergruppe «Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger». (2009). Influenza Virus. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 36(1), 32–39. <https://doi.org/10.1159/000197314>
- Baldo, V., Bertoncello, C., Cocchio, S., Fonzo, M., Pillon, P., Buja, A., & Baldovin, T. (2016). The new pandemic influenza A/(H1N1) pdm09 virus: Is it really “new”? *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(1), E19-22.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Camp, J. V., & Jonsson, C. B. (2017). A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease. *Frontiers in Immunology*, 8, 550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00550>
- Cassatella, M. A., Östberg, N. K., Tamassia, N., & Soehnlein, O. (2019). Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends in Immunology*, 40(7), 648–664. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.003>
- Castillejos, M., Cabello-Gutiérrez, C., Alberto Choreño-Parra, J., Hernández, V., Romo, J., Hernández-Sánchez, F., Martínez, D., Hernández, A., Jiménez-Álvarez, L., Hernández-Cardenas, C. M., Becerril-Vargas, E., Martínez-Orozco, J. A., Luis Sandoval-Gutiérrez, J., Guadarrama, C., Olvera-Masetto, E., Alfaro-Ramos, L., Cruz-Lagunas, A., Ramírez, G., Márquez, E., ... Zúñiga, J. (2019). High performance of rapid influenza diagnostic test and variable effectiveness of influenza vaccines in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 89, 87–95.
- Chen, X., Liu, S., Goraya, M. U., Maarouf, M., Huang, S., & Chen, J.-L. (2018). Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 320. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>
- Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2019). Intracellular Neutrophil Oxidants: From Laboratory Curiosity to Clinical Reality. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 202(11), 3127–3134. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900235>
- De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., & Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, 121(24), 4930–4937. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>
- Dirección General de Epidemiología. (DGE). (2023). <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-2023>. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-2023>
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2), 120–136. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Dubovi, E. J., Fenner, F., & Maclachlan, N. J. (2011). *Fenner's veterinary virology edited by N.*

- Maclachlan and Edward J. Dubovi* (4th ed). Elsevier/AP.
- Evrard, M., Kwok, I. W. H., Chong, S. Z., Teng, K. W. W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J. L., Penny, H. L., Ching, G. C., Devi, S., Adrover, J. M., Li, J. L. Y., Liong, K. H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J. W., Su, I.-H., Balabanian, K., ... Ng, L. G. (2018). Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity*, *48*(2), 364-379.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002>
- Felgenhauer, J. L., Brune, J. E., Long, M. E., Manicone, A. M., Chang, M. Y., Brabb, T. L., Altemeier, W. A., & Frevert, C. W. (2020). Evaluation of Nutritional Gel Supplementation in C57BL/6J Mice Infected with Mouse-Adapted Influenza A/PR/8/34 Virus. *Comparative Medicine*, *70*(6), 471–486. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-20-990138>
- Ferreira, A. C., Sacramento, C. Q., Pereira-Dutra, F. S., Fintelman-Rodrigues, N., Silva, P. P., Mattos, M., de Freitas, C. S., Marttorelli, A., de Melo, G. R., Campos, M. M., Azevedo-Quintanilha, I. G., Carlos, A. S., Emídio, J. V., Garcia, C. C., Bozza, P. T., Bozza, F. A., & Souza, T. M. L. (2023). Severe influenza infection is associated with inflammatory programmed cell death in infected macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1067285. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1067285>
- Filippone, R. T., Dargahi, N., Eri, R., Uranga, J. A., Bornstein, J. C., Apostolopoulos, V., & Nurgali, K. (2022). Potent CCR3 Receptor Antagonist, SB328437, Suppresses Colonic Eosinophil Chemotaxis and Inflammation in the Winnie Murine Model of Spontaneous Chronic Colitis. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7780. <https://doi.org/10.3390/ijms23147780>
- Flerlage, T., Boyd, D. F., Meliopoulos, V., Thomas, P. G., & Schultz-Cherry, S. (2021). Influenza virus and SARS-CoV-2: Pathogenesis and host responses in the respiratory tract. *Nature Reviews. Microbiology*, *19*(7), 425–441. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00542-7>
- George, S. T., Lai, J., Ma, J., Stacey, H. D., Miller, M. S., & Mullarkey, C. E. (2021). Neutrophils and Influenza: A Thin Line between Helpful and Harmful. *Vaccines*, *9*(6), 597. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060597>
- Gong, L., & Wilhelm, R. S. (2009). CCR3 antagonists: A survey of the patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *19*(8), 1109–1132. <https://doi.org/10.1517/13543770903008544>
- Hartl, D., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Hordijk, P. L., Kuijpers, T. W., Hoffmann, F., Hector, A., Eber, E., Marcos, V., Bittmann, I., Eickelberg, O., Griese, M., & Roos, D. (2008). Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases. *The Journal of Immunology*, *181*(11), 8053–8067. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.8053>
- Hidalgo, A., Chilvers, E. R., Summers, C., & Koenderman, L. (2019). The Neutrophil Life Cycle. *Trends in Immunology*, *40*(7), 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-alpha: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England)*, *49*(7), 1215–1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Hu, Z., Lin, J., Chen, J., Cai, T., Xia, L., Liu, Y., Song, X., & He, Z. (2021a). Overview of Viral Pneumonia Associated With Influenza Virus, Respiratory Syncytial Virus, and

- Coronavirus, and Therapeutics Based on Natural Products of Medicinal Plants. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 630834. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.630834>
- Hu, Z., Lin, J., Chen, J., Cai, T., Xia, L., Liu, Y., Song, X., & He, Z. (2021b). Overview of Viral Pneumonia Associated With Influenza Virus, Respiratory Syncytial Virus, and Coronavirus, and Therapeutics Based on Natural Products of Medicinal Plants. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 630834. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.630834>
- Ibekwe, T. S., Kwaghe, V., Garba, H. Z., & Ibekwe, P. U. (2021). The Role of Antiviral Drugs in the Case-Management of Respiratory Syncytial Virus, Influenza and COVID-19. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals*, 0(0), 1–5. <https://doi.org/10.35248/1948-5964.13.s16.002>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2023). *Orthomyxoviridae*. [https://ictv.global/report\\_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae](https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae)
- Iwasaki, A., & Pillai, P. S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews. Immunology*, 14(5), 315–328. <https://doi.org/10.1038/nri3665>
- Jaumouillé, V., & Waterman, C. M. (2020). Physical Constraints and Forces Involved in Phagocytosis. *Frontiers in Immunology*, 11, 1097. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01097>
- Kim, M.-H., Yang, D., Kim, M., Kim, S.-Y., Kim, D., & Kang, S.-J. (2017). A late-lineage murine neutrophil precursor population exhibits dynamic changes during demand-adapted granulopoiesis. *Scientific Reports*, 7, 39804. <https://doi.org/10.1038/srep39804>
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M., & Blödmern, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, 68(2), 426–439. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90284-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90284-6)
- Koonin, L. M., & Patel, A. (2018). Timely Antiviral Administration During an Influenza Pandemic: Key Components. *American Journal of Public Health*, 108(S3), S215–S220. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304609>
- Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 82(1), e00057-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00057-17>
- Li, B., Dong, C., Wang, G., Zheng, H., Wang, X., & Bai, C. (2011). Pulmonary epithelial CCR3 promotes LPS-induced lung inflammation by mediating release of IL-8. *Journal of Cellular Physiology*, 226(9), 2398–2405. <https://doi.org/10.1002/jcp.22577>
- Liew, P. X., & Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological Reviews*, 99(2), 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>
- Macias, A. E., McElhaney, J. E., Chaves, S. S., Nealon, J., Nunes, M. C., Samson, S. I., Seet, B. T., Weinke, T., & Yu, H. (2021). The disease burden of influenza beyond respiratory illness. *Vaccine*, 39 Suppl 1, A6–A14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.048>
- Mifsud, E. J., Kuba, M., & Barr, I. G. (2021). Innate Immune Responses to Influenza Virus Infections in the Upper Respiratory Tract. *Viruses*, 13(10), 2090. <https://doi.org/10.3390/v13102090>
- Nauseef, W. M. (2023). Human neutrophils ≠ murine neutrophils: Does it matter? *Immunological Reviews*, 314(1), 442–456. <https://doi.org/10.1111/imr.13154>
- Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249), 931–939. <https://doi.org/10.1038/nature08157>

- Noda Albelo, A., Vidal Tallet, L. A., Araña Rosaínz, M., & Casal Menéndez, A. X. (2010). Mecanismos biológicos implicados en el comportamiento epidemiológico y patogénico de la influenza. *Revista Cubana de Pediatría*, 82(2), 0–0.
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO). (2001). Boletín Epidemiológico, v. 22, n.3, Sep. 2001. *Boletín Epidemiológico*;v. 22. 2001. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56971>
- Payne, S. (2017). Family Orthomyxoviridae. En *Viruses* (pp. 197–208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00023-4>
- Pease, J. E., & Horuk, R. (2014). Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 9(5), 467–483. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.897324>
- Perez-Lopez, A., Silva, S., Lee, M. H., Dillon, N., Brandt, S. L., Gerner, R. R., Melchior, K., Walker, G. T., Sosa-Hernandez, V. A., Cervantes-Diaz, R., Romero-Ramirez, S., Maravillas-Montero, J. L., Nuccio, S.-P., Nizet, V., & Raffatellu, M. (2021). *CCL28 modulates neutrophil responses during infection with mucosal pathogens* [Preprint]. *Immunology*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.19.436197>
- Perrone, L. A., Plowden, J. K., García-Sastre, A., Katz, J. M., & Tumpey, T. M. (2008). H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathogens*, 4(8), e1000115. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000115>
- Ramos, I., & Fernandez-Sesma, A. (2012). Cell receptors for influenza a viruses and the innate immune response. *Frontiers in Microbiology*, 3, 117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00117>
- Rosales, C., Lowell, C. A., Schnoor, M., & Uribe-Querol, E. (2017). Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity 2017. *Journal of Immunology Research*, 2017, 9748345. <https://doi.org/10.1155/2017/9748345>
- Rothberg, M. B., Haessler, S. D., & Brown, R. B. (2008). Complications of viral influenza. *The American Journal of Medicine*, 121(4), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.10.040>
- Rudd, J. M., Pulavendran, S., Ashar, H. K., Ritchey, J. W., Snider, T. A., Malayer, J. R., Marie, M., Chow, V. T. K., & Narasaraju, T. (2019). Neutrophils Induce a Novel Chemokine Receptors Repertoire During Influenza Pneumonia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 108. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00108>
- Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F., & Zhuang, X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(6), 567–573. <https://doi.org/10.1038/nsmb769>
- Ryu, S., & Cowling, B. J. (2021). Human Influenza Epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(12), a038356. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038356>
- Salomon, R., & Webster, R. G. (2009). The influenza virus enigma. *Cell*, 136(3), 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.029>
- Samji, T. (2009). Influenza A: Understanding the viral life cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 82(4), 153–159.
- Scholtissek, C. (1985). Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated



- temperature. *Vaccine*, 3(3 Suppl), 215–218. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90109-4)
- Shen, J. B., Jiang, B., & Pappano, A. J. (2000). Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294(2), 562–570.
- Short, K. R., Kroeze, E. J. B. V., Fouchier, R. A. M., & Kuiken, T. (2014). Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(1), 57–69. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70286-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70286-X)
- Shtyrya, Y. A., Mochalova, L. V., & Bovin, N. V. (2009). Influenza virus neuraminidase: Structure and function. *Acta Naturae*, 1(2), 26–32.
- Simonsen, L., Spreeuwenberg, P., Lustig, R., Taylor, R. J., Fleming, D. M., Kroneman, M., Van Kerkhove, M. D., Mounts, A. W., Paget, W. J., & the GLaMOR Collaborating Teams. (2013). Global Mortality Estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR Project: A Modeling Study. *PLoS Medicine*, 10(11), e1001558. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001558>
- Stephenson, I., & Zambon, M. (2002). The epidemiology of influenza. *Occupational Medicine (Oxford, England)*, 52(5), 241–247. <https://doi.org/10.1093/occmed/52.5.241>
- Sugamata, R., Dobashi, H., Nagao, T., Yamamoto, K., Nakajima, N., Sato, Y., Aratani, Y., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., & Suzuki, K. (2012). Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection: R. Sugamata et al. *Microbiology and Immunology*, 56(3), 171–182. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00424.x>
- Suliman, H. B., Ryan, L. K., Bishop, L., & Folz, R. J. (2001). Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(1), L69-78. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.1.L69>
- Sun, Y., Li, C., Shu, Y., Ju, X., Zou, Z., Wang, H., Rao, S., Guo, F., Liu, H., Nan, W., Zhao, Y., Yan, Y., Tang, J., Zhao, C., Yang, P., Liu, K., Wang, S., Lu, H., Li, X., ... Jiang, C. (2012). Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection. *Science Signaling*, 5(212), ra16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001931>
- Tsioumpekou, M., Krijgsman, D., Leusen, J. H. W., & Olofsen, P. A. (2023). The Role of Cytokines in Neutrophil Development, Tissue Homing, Function and Plasticity in Health and Disease. *Cells*, 12(15), 1981. <https://doi.org/10.3390/cells12151981>
- Ueda, Y., Kondo, M., & Kelsoe, G. (2005). Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1771–1780. <https://doi.org/10.1084/jem.20041419>
- Van Hoecke, L., Job, E. R., Saelens, X., & Roose, K. (2017). Bronchoalveolar Lavage of Murine Lungs to Analyze Inflammatory Cell Infiltration. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 123, 55398. <https://doi.org/10.3791/55398>
- Veda, P. (2011). Why are Neutrophils Polymorphonuclear? *European Journal of Inflammation*, 9(2), 85–93. <https://doi.org/10.1177/1721727X1100900201>
- World Health Organization (WHO). (2023). *Influenza (seasonal)*. <https://www.who.int/health->

topics/influenza-seasonal

- Wu, W., & Metcalf, J. P. (2020). The Role of Type I IFNs in Influenza: Antiviral Superheroes or Immunopathogenic Villains? *Journal of Innate Immunity*, 12(6), 437–447. <https://doi.org/10.1159/000508379>
- Yang, J., Liu, S., Du, L., & Jiang, S. (2016). A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: Implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Reviews in Medical Virology*, 26(4), 242–250. <https://doi.org/10.1002/rmv.1879>
- Yamazaki, M. (1994). [TNF-alpha]. *Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy*, 21(15), 2679–2687.
- Zemans, R. L., & Matthay, M. A. (2017). What drives neutrophils to the alveoli in ARDS? *Thorax*, 72(1), 1–3. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209170>
- Zhou, W.-J., Liu, G.-Q., Li, L.-B., Zhang, X.-G., & Lu, P.-R. (2012). Inhibitory effect of CCR3 signal on alkali-induced corneal neovascularization. *International Journal of Ophthalmology*, 5(3), 251–257. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2012.03.01>
- Zúñiga, J., Torres, M., Romo, J., Torres, D., Jiménez, L., Ramírez, G., Cruz, A., Espinosa, E., Herrera, T., Buendía, I., Ramírez-Venegas, A., González, Y., Bobadilla, K., Hernández, F., García, J., Quiñones-Falconi, F., Sada, E., Manjarrez, M. E., Cabello, C., ... Selman, M. (2011). Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico City. *Autoimmunity*, 44(7), 562–570. <https://doi.org/10.3109/08916934.2011.592885>