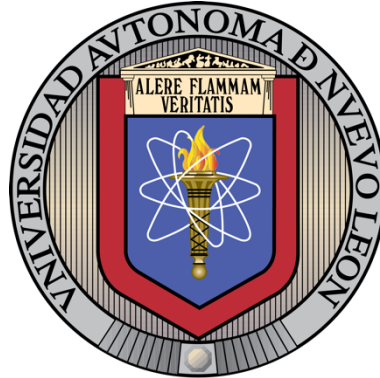


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**ANÁLISIS DE LA ACCIÓN DE LA DIETILCARBAMACINA SOBRE
EFECTORES DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL EN CÉLULAS
EPITELIALES INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA
INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Por:

Q.B.C. LUIS CARLOS RUELAS RUIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

Julio 2024

**ANÁLISIS DE LA ACCIÓN DE LA DIETILCARBAMACINA SOBRE EFECTORES DE
LA RESPUESTA ANTIVIRAL EN CÉLULAS EPITELIALES INFECTADAS CON EL
VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Aprobación de la Tesis.



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Director



Dr. Med. Carlos Eduardo Medina De La Garza

Codirector



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado


**ANÁLISIS DE LA ACCIÓN DE LA DIETILCARBAMACINA SOBRE EFECTORES DE
LA RESPUESTA ANTIVIRAL EN CÉLULAS EPITELIALES INFECTADAS CON EL
VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 pdm09**

Presentado por:


Q.B.C. Luis Carlos Ruelas Ruiz

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento y Servicio de inmunología de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adrián Giovanni Rosas Taraco y la co-dirección del Dr. C. Carlos Eduardo Medina De La Garza.

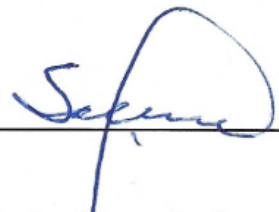
Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: **I23-00076**.



Dr. C. Adrián Giovanni Rosas Taraco
Director de Tesis



**Dr. Med. Carlos Eduardo Medina
De La Garza**
Codirector



**Dr. C. Mario César Salinas
Carmona**
Miembro de la Comisión

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la fuerza, sabiduría y paciencia para concluir esta etapa la cual es una de las tantas bendiciones con las cuales me manifiestas tu amor y presencia.

A mi papá, Ismael Ruelas

Por llenarme de valores y disciplina que hoy me convierten en un ser capaz de luchar por cumplir sus metas. Contar con tu apoyo en cada una de mis decisiones siempre me ha impulsado a dar lo mejor de mí pues con eso me llevo siempre la certeza de que hago lo correcto, ya que tú crees en mi potencial. Gracias por ser un padre ejemplar y siempre confiar en mí.

A mi mamá, Anita Ruiz

Por siempre enseñarme a no rendirme diciendo que no existe el “no puedo”. Tú en cada desafío siempre me has llenado de ánimos para intentarlo, para seguirme esforzando y para lograrlo. Tú me has hecho llegar hasta aquí pues eres mi motor y mi más real ejemplo para seguir. Gracias por tu amor incondicional y por tu auténtica forma de ser mi mamá.

A mis hermanos, Daniel y Kevin

Por siempre ser mi alegría e impulsarme a seguir en esto. Ustedes me mantienen fuerte.

A Diana Arce

Por ser mi más grande motivación durante estos dos años. Gracias por ser siempre mi más sólido soporte y apoyo en todo momento, te amo.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Adrián Rosas quien no solo se esforzó por ser un excelente y destacable director de tesis, sino también demostró ser un ejemplar ser humano a través de su paciencia, comprensión y orientación brindadas en todo momento. Agradezco tener su asesoría y haber estado en su laboratorio, ya que ambas han sido indispensables para mi desarrollo en este entorno y me han motivado aún más a seguir haciendo ciencia.

Al Dr. Carlos Medina, por su apoyo desde mis primeros seminarios y todas sus enseñanzas que fácilmente logra transmitir. Aprecio mucho su empeño por siempre ayudar y guiar al estudiante estando siempre pendiente del proyecto y de mi avance en el posgrado.

Al Dr. Mario Salinas por darme la oportunidad de ser parte del servicio de inmunología al aceptarme en el programa de Maestría en Ciencias. Reconozco que sus conocimientos compartidos han sido pieza clave en mi aprendizaje lo cual le agradezco.

A todos y cada uno de los profesores del Servicio de Inmunología por su dedicación y excepcional enseñanza a lo largo de estos dos años.

Particularmente agradezco a la Dra. Alma Y. Arce por siempre estar disponible para escucharme, por su orientación y por su disposición permitiendo hacer uso del laboratorio inmunoinfectología.

A la Dra. Ángeles Castro por su gran dedicación y compromiso con los estudiantes lo cual estoy seguro tendrá un impacto positivo duradero en mí.

Al Dr. Noé Macías por su labor y su vocación de enseñar. De verdad, fue de gran ayuda para mí cuando me orientó para uno de mis seminarios.

Al Dr. Manuel Mejía por mostrar las capacidades que se esconden detrás de mí como estudiante y por asegurarse de que comprenda y aproveche al máximo lo que se me ofrece en el posgrado.

A la Dra. Nallely López por siempre tener la disposición de acercarse a brindarme su retroalimentación y apoyo continuo en clases y seminarios.

A la Dra. Anna V. Vázquez por su excelente labor como profesora y por su reconocimiento y palabras de ánimo brindadas en mi trayecto.

Al Dr. Ángel González por su guía y orientación a lo largo de la maestría. Esas pláticas en donde siempre encontró la forma de motivarme y estimular mi interés en el aprendizaje fueron fundamentales.

A la Q.C.B. Azalia Martínez por su apoyo, paciencia y soporte en el desarrollo de mis experimentos de laboratorio. Agradezco tu esfuerzo por siempre ayudar pues eso refleja tu gran calidad humana.

A mis compañeros de Inmunología: Kenia, Edgar, Antonio, Raquel, Diana, Luisa, Tomás, Óscar y Benito por todos los buenos momentos y las experiencias compartidas.

A Víctor y Jackie por su amistad, por los buenos ratos durante esta etapa y por su gran apoyo.

A mis familiares y a todos mis amigos de Cd. Obregón que siempre estuvieron al pendiente: Javier, Luis Mario, Rubén, mis primos Cesar, José Ángel, Martín y todos aquellos que se hacían presentes.

Por último, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante dos años de estudio en el programa de Maestría en Ciencias (CVU/Becario 1232424).

RESUMEN

Q.B.C. Luis Carlos Ruelas Ruiz

Fecha de titulación: Julio, 2024

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Título del estudio: Análisis de la acción de la dietilcarbamacina sobre efectores de la respuesta antiviral en células epiteliales infectadas con el virus de la influenza A H1N1 pdm09.

Número de páginas: 74

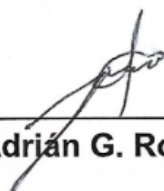
Candidato para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica.

Área de estudio: Inmunología

Propósito y diseño del estudio: La influenza es una infección viral que afecta a todos los grupos etarios y tiene alto potencial pandémico. La respuesta inmune es clave para resolver la enfermedad, pero en algunos casos, provoca una desregulación inmune (tormenta de citocinas) capaz de causar daño tisular, fibrosis y muerte del tejido. Se sugiere el uso de fármacos con efecto inmunomodulador como el del derivado de la piperazina, la dietilcarbamacina (DEC), que ha sido estudiado y ha mostrado efectos antiinflamatorios y antifibróticos en modelos previos. Sin embargo, se desconoce la actividad de la DEC en infecciones respiratorias virales. Como objetivo se analizó la acción de la DEC en un modelo de células de epitelio respiratorio infectadas por el Virus de Influenza A H1N1 pdm09 (VIA). Para ello, se cultivaron células A549 e incubaron con VIA para ser tratadas con DEC. A partir del sobrenadante, se cuantificó el título viral y la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 y RANTES. Se realizó RT-qPCR para evaluar la expresión de los genes que codifican para RIG-I, TLR3, MYD88, NLRP3, NF- κ B, IFN- β e IFN- λ .

Contribuciones y conclusiones: La DEC mantiene la expresión de IFN- λ 1, regula los niveles de IFN- β e IL-8 y reduce la carga viral en células epiteliales infectadas por el VIA. Estos hallazgos demostraron que la DEC contribuye en la modulación de la respuesta inmunológica de las células epiteliales contra el VIA, siendo capaces también de favorecer la eliminación de las partículas virales.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
CAPITULO 1	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Virus de la influenza.....	1
1.1.1 Influenza: Transmisión y síntomas.....	2
1.1.2 Epidemiología del virus de la influenza.....	3
1.2 Células epiteliales de vías respiratorias.....	5
1.3 Inmunidad frente a los virus.....	6
1.3.1 Inmunidad innata frente a los virus.....	7
1.3.2 Inmunidad adaptativa frente a los virus	8
1.4 Hiperactivación inmune y tormenta de citocinas.....	8
1.5 Tratamiento antiviral.....	9
1.5.1 Alternativas terapéuticas.....	10
1.5.2 Dietilcarbamacina como inmunomodulador.....	11
CAPITULO 2	
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Papel de las células epiteliales de vías respiratorias en la respuesta inmune contra el virus de la influenza.....	13
2.2 Dietilcarbamacina y su efecto inmunomodulador.....	15
CAPITULO 3	
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
CAPITULO 4	
4. HIPOTESIS.....	18
CAPITULO 5	
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivo específico.....	19

CAPITULO 6

6. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1 Líneas celulares.....	20
6.2 Virus.....	20
6.3 Ensayos de viabilidad celular.....	20
6.4 Modelo de infección.....	21
6.5 Análisis multiplex de citocinas.....	21
6.6 Expresión de genes.....	22
6.7 Cuantificación de TNF α por inmunoensayo ligado a enzima.....	23
6.8 Título viral.....	23
6.9 Estrategia general.....	23
6.10 Análisis estadístico.....	25

CAPITULO 7

7. RESULTADOS.....	26
7.1 Viabilidad de células A549 tratadas con dietilcarbamacina.....	26
7.2 Determinación de la multiplicidad de infección a través de titulación viral.....	29
7.3 Análisis de la expresión de genes en cultivos de células epiteliales tratadas con distintas concentraciones de dietilcarbamacina.....	29
7.4 Análisis de la concentración de citocinas en sobrenadantes de cultivos de células epiteliales tratadas con distintas concentraciones de dietilcarbamacina.....	35
7.5 Análisis del efecto de la dietilcarbamacina sobre el título viral.....	38

CAPITULO 8

8. DISCUSIÓN.....	40
-------------------	----

CAPITULO 9

9. CONCLUSIÓN.....	46
--------------------	----

CAPITULO 10

10. PERSPECTIVAS.....	47
-----------------------	----

REFERENCIAS.....	48
-------------------------	-----------

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	60
------------------------------------	-----------

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pandemias por Virus de Influenza A en el siglo XX y XXI.....	1
Tabla 2. Poblaciones con alto riesgo de complicaciones por virus de la influenza....	3
Tabla 3. Limites de detección y cuantificación de citocinas.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmisión del VIA H1N1.....	2
Figura 2. Porcentaje de muestras positivas a influenza, por zona de transmisión de influenza.....	4
Figura 3. Casos positivos a influenza acumulados de la semana 40 del 2023 a la 20 de 2024.....	4
Figura 4. Formula estructural de dietilcarbamacina.....	12
Figura 5. Respuesta inmune de células epiteliales contra el VIA.....	14
Figura 6. Esquema de la estrategia general.....	24
Figura 7. Imágenes representativas de la monocapa de cultivo de células A549 + DEC.....	27
Figura 8. Ensayo de citotoxicidad de la DEC en células A549.....	28
Figura 9. Imágenes representativas de la monocapa celular infectada con stock viral.....	29
Figura 10. Niveles de expresión de genes clave relacionados con receptores de reconocimiento de patrones en la respuesta inmune.....	30
Figura 11. Niveles de expresión de genes clave relacionados con vías de señalización de la respuesta inmune.....	32
Figura 12. Niveles de expresión de genes clave relacionados con la respuesta de interferones tipo I y III.....	34
Figura 13. Niveles de secreción de citocinas proinflamatorias.....	36
Figura 14. Niveles de secreción de citocinas pertenecientes a la familia de las quimiocinas.....	37
Figura 15. Título viral de sobrenadantes.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico (ADN)
AIM2	Del inglés “Absent In Melanoma 2”
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Del inglés “American Type Culture Collection”
BSA	Del inglés “Bovine Serum Albumin”
BXM	Baloxavir Marboxil
CDC	Del inglés “Centers for Disease Control and Prevention”
CEACAM-1	Del inglés “Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1”
cGAS	Del inglés “Cyclic GMP-AMP synthase”
CO ₂	Dióxido de carbono
DEC	Dietilcarbamacina
ECL	Efecto citolítico
ECP	Efecto citopático
ELISA	Del inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay”
EMEM	Del inglés “Eagle’s minimum essential médium”
F12K	Del inglés “Kaighn’s modification of Ham’s F-12 Medium”
FBS	Del inglés “Fetal Bovine Serum”
HLA	Del inglés “Human Leukocyte Antigens”
IC50	Del inglés “Half-maximal inhibitory concentration”
IFN	Del inglés “Interferon”
IFNR	Receptor de interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IRF	Del inglés “Interferon Regulatory Factor”
ISG	Del inglés “Interferon-Stimulated Genes”
IVGM	Del inglés “Influenza Virus Growth Medium”

JAK/STAT	Del inglés “Janus kinase/signal transduction and transcription activation”
M-MLV	Del inglés “Moloney Murine Leukemia Virus”
M2	Proteína de Matriz-2
MDA5	Del inglés “melanoma differentiation-associated protein 5”
MDCK	Del inglés “Madin-Darby Canine Kidney”
MEM	Del inglés “Minimum Essential Medium”
MHC	Del inglés “Major Histocompatibility Complex”
MOI	Del inglés “Multiplicity Of Infection”
mRNA	Del inglés “Messenger RNA”
MTT	Del inglés “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”
MYD88	Del inglés “Myeloid differentiation primary response 88”
NA	Neuraminidasa
NF- κ B	Del inglés “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NK	Del inglés “Natural Killer”
NLRP3	Del inglés “nucleotide-binding domain, leucine-rich–containing family, pyrin domain–containing-3”
NOD2	Del inglés “Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2”
PAMP	Del inglés “Pathogen-associated molecular patterns”
Pdm09	Del inglés “Pandemic Disease Mexico 2009”
PRR	Del inglés “Pattern Recognition Receptors”
RANTES	Del inglés “Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted”
RIG-I	Del inglés “Retinoic acid-inducible gene-I”
RT-qPCR	Del inglés “Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction”
SARS-CoV2	Del inglés “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2”
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

TCID ₅₀	Del inglés “Fifty-percent Tissue Culture Infectious Dose”
TLR	Del inglés “Toll Like Receptor”
TNF- α	Del inglés “Tumor Necrosis Factor Alpha”
TPCK	Del inglés “Tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone”
VIA	Virus de la Influenza A
WHO	Del inglés “World Health Organization”

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Virus de la Influenza.

Las infecciones agudas de vías respiratorias son causa importante de morbilidad y mortalidad y afectan a todos los grupos etarios, desde poblaciones pediátricas hasta poblaciones de la tercera edad (1). Los agentes causales más frecuentes y relevantes son una amplia gama de virus respiratorios, entre los cuales se encuentra el Virus de la Influenza A (VIA) (2).

La influenza es una de las principales infecciones agudas de vías respiratorias y se considera un problema de salud pública en todo el mundo (3). Los VIA son virus de ARN monocatenario en sentido negativo envueltos que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de influenza se clasifican en cuatro tipos: A, B, C y D; siendo los virus A y B los que causan epidemias estacionales de la enfermedad (4). Aunque ambos tipos del virus de la influenza se comportan de manera similar en este aspecto, es el VIA, el único con capacidad de causar pandemias, según observamos en la tabla 1 (5). Los VIA se dividen en subtipos según dos proteínas de la superficie del virus: la hemaglutinina y la neuraminidasa; En base a ello, se tiene la circulación habitual VIA H1N1 y VIA H3N2 (6,7).

Tabla 1. Pandemias por Virus de Influenza A en el siglo XX y XXI.

PANDEMIAS SIGLO XX-XXI	
Año	Virus
1918	VIA H ₁ N ₁
1957	VIA H ₂ N ₂
1968	VIA H ₃ N ₂
2009	VIA H ₁ N ₁

1.1.1 Influenza: transmisión y síntomas.

El padecimiento ocasionado por los virus de influenza se conoce como Influenza y esta se propaga a través de la generación de aerosoles los cuales están formados por gotículas cargadas con las partículas virales. Aquellas de gran tamaño y peso se depositan en superficies, mientras aquellas de menor densidad permanecen suspendidas en el aire facilitando su inhalación por parte del siguiente hospedador garantizando la propagación del virus y el comienzo de la infección, figura 1 (8).

Cuando el virus de la influenza ocasiona la enfermedad se observan una serie de síntomas, normalmente van acorde a un cuadro de resfriado común (fiebre, tos, cefalea, mialgias y artralgias, malestar general intenso, faringitis y rinorrea). En una mínima proporción de pacientes pueden tener un comienzo fuerte o persistir con síntomas por más de dos semanas, pero en la mayoría de los casos las personas infectadas se recuperan después de una semana sin necesidad de atención médica (1,3). También existen poblaciones con alto riesgo de complicaciones que pueden tener una infección grave y requerir hospitalización o incluso fallecer a causa de la enfermedad de influenza, tabla 2 (9,10).

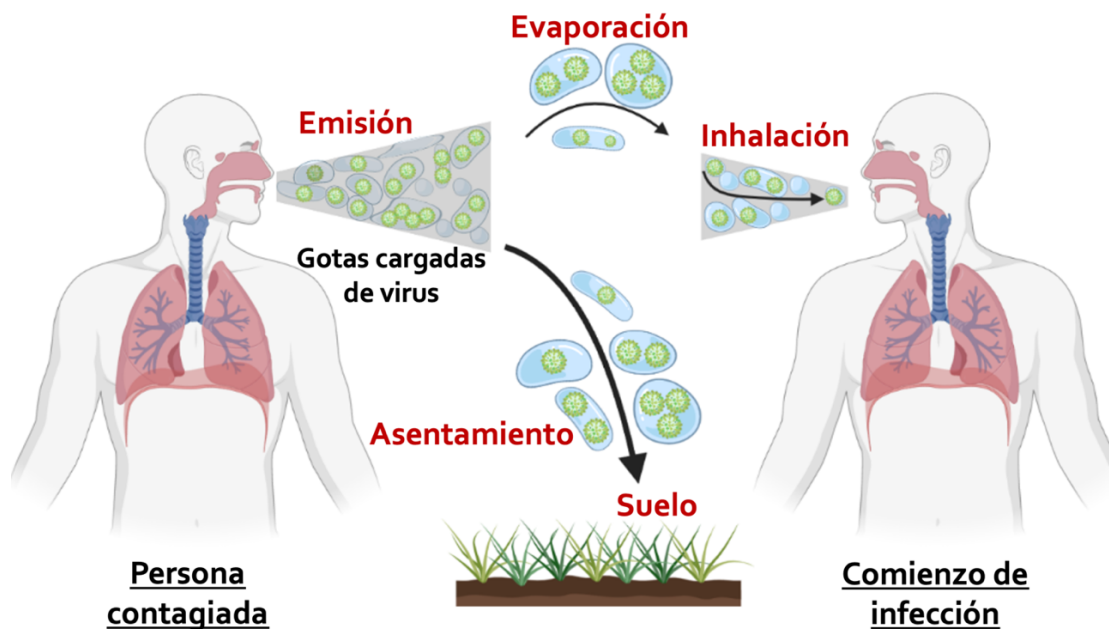


Figura 1. Transmisión del VIA H1N1. Las partículas virales se propagan por una persona contagiada y favorece el comienzo de la infección en individuos.

Tabla 2. Poblaciones con alto riesgo de complicaciones por virus de la influenza.

POBLACIÓN CON ALTO RIESGO DE COMPLICACIONES POR INFLUENZA			
			
Mujeres embarazadas	Niños	Adultos de la tercera edad	Pacientes inmunodeprimidos
			
Trabajadores del sector salud	Pacientes con enfermedades crónicas	Personas con obesidad	

1.1.2 Epidemiología del virus de influenza.

Diversas organizaciones nacionales e internacionales que promueven la protección de la salud han decidido poner su atención en este virus y mantener un sistema de vigilancia constante respecto al comportamiento y distribución geográfica del virus de influenza (11,12). El virus de influenza conserva su importancia epidemiológica a nivel mundial teniendo una distribución en donde predominan diversos subtipos del virus de influenza en diferentes zonas geográficas siendo en algunos predominante el VIA H3N2, así como en otras áreas el VIA H1N1 pdm09 o el Virus de Influenza B, figura 2 (3,7,11).

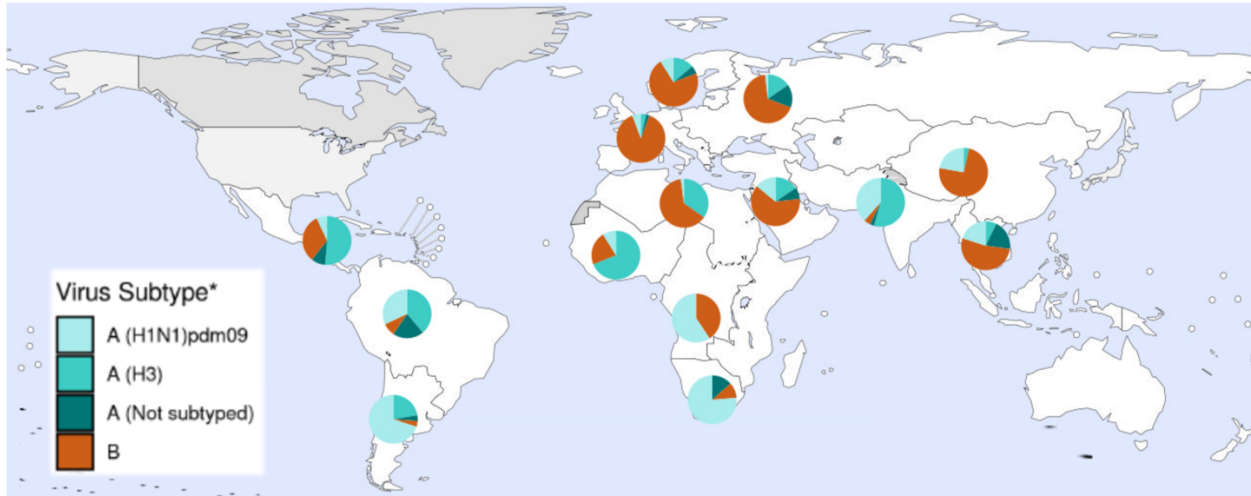


Figura 2. Porcentaje de muestras positivas a influenza, por zona de transmisión de influenza. Mapa generado el 12 de mayo del 2024. Influenza Update N° 476, 22 May 2024, based on data up to 12 May 2024, WHO (13).

A un nivel nacional también se observa cómo se mantiene el valor epidemiológico del virus a través de los periodos estacionales, lo cual demuestra que el virus permanece latente. Los datos de casos de influenza por entidad federativa indican la alta relevancia epidemiológica de este virus. A nivel estatal Nuevo León ocupa el primero y segundo lugar en la proporción de casos y defunciones, respectivamente, figura 3 (6).

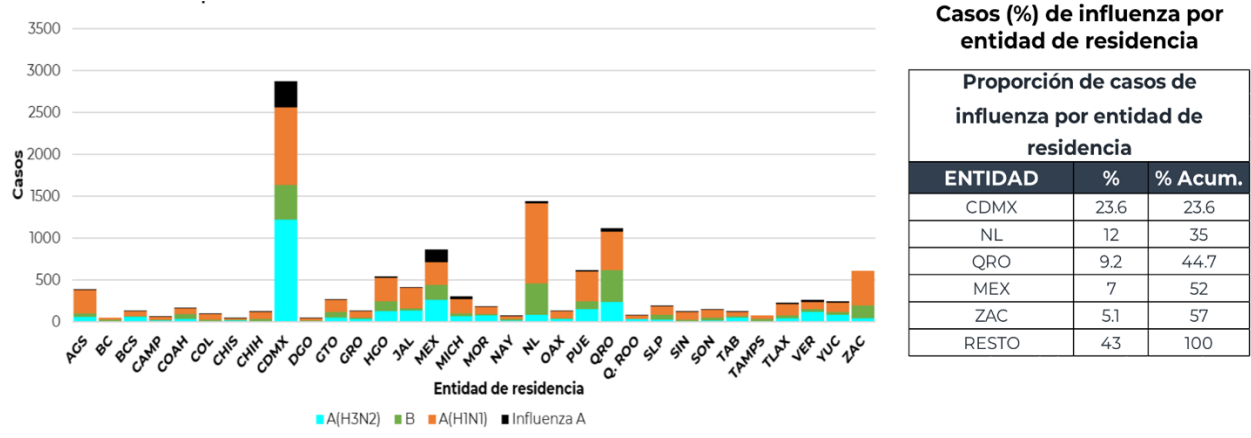


Figura 3. Casos positivos a influenza acumulados de la semana 40 del 2023 a la 20 de 2024. SINAVE/DGE/SSA/Sistema de Vigilancia epidemiológica de Enfermedad Respiratoria Viral, 16/05/24 (6).

1.2 Células epiteliales de vías respiratorias.

El pulmón es uno de los órganos más expuestos a microorganismos y a otros agentes extraños. Entre el alto volumen diario que se inhala de aire al día, existe la interacción y el intento de una colonización por parte de microorganismos en donde una respuesta inmunitaria efectiva determina la homeostasis pulmonar (14,15). El epitelio respiratorio ha demostrado no constituir solamente una simple barrera física capaz de secretar moco y algunas enzimas, sino también se ha descrito la capacidad de las células epiteliales para responder a diversos microorganismos y estímulos nocivos secretando moléculas relacionadas con la respuesta inmune como quimiocinas, citocinas, defensinas, entre otras (14,15).

Las diversas células epiteliales que recubren el pulmón han sido identificadas en base a sus características estructurales, patrones de expresión de genes y de proteínas, así como algunas funciones únicas en cada una de ellas (16). Actualmente, se reconoce que las células epiteliales de epitelio respiratorio tienen una gama mucho más amplia de funciones clave en la defensa respiratoria del hospedero a través de una variedad de mecanismos (17,18). Entre estos se incluyen el metabolismo de sustancias tóxicas que son inhaladas, el transporte de líquidos y iones, la producción de una variedad de moléculas incluidos los péptidos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos. A pesar de su importante papel en la inmunidad innata, estas células igualmente son un vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa, por ejemplo mediante el transporte de IgM e IgA poliméricas en las vías respiratorias (19). El epitelio de las vías respiratorias está compuesto por múltiples tipos de células funcionalmente distintas: incluidas entre ellas las células basales, células basales cíclicas, células basales que experimentan transición epitelial-mesenquimatosa, células intermedias, células club, células caliciformes, células ciliadas, ionocitos, células de penacho y células neuroendocrinas pulmonares (20). Las alteraciones en la función de las células epiteliales son un sello distintivo de una gran variedad de enfermedades pulmonares agudas y crónicas (19) lo cual hace pertinente conocer los mecanismos de respuesta inmunológica que desempeñan dichas células contra virus respiratorios como el VIA.

Las proteínas inmunes intrínsecas que se expresan constitutivamente y exhiben función antiviral son la primera línea de defensa contra los virus. Además de ello, los interferones de tipo I (como el interferón- α (IFN α) y el interferón- β (IFN β), el interferón de tipo II (IFN γ) y los interferones de tipo III (IFN λ 1–4) producidos tras la detección del virus por parte del sistema inmunológico innato dan lugar a niveles adicionales de protección intrínseca que detienen la acción del virus de propagarse entre las células. El repertorio colectivo de factores intrínsecos constitutivos e inducidos se dirige a todos los pasos del ciclo de vida del virus, incluida la entrada a las células, para prevenir la infección en un número limitado de células. Como resultado, una respuesta intrínseca eficaz puede prevenir o amortiguar la enfermedad viral antes del inicio de la inmunidad adaptativa (21–23).

1.3 Inmunidad frente a los virus

Los virus son partículas orgánicas infecciosas formadas por DNA o RNA, una cubierta proteica y en algunos casos, una bicapa lipídica. Estos agentes son intracelulares obligados que usan la maquinaria del hospedador para replicarse. Su forma de infección es a través de una endocitosis mediada por el receptor tras la unión a moléculas celulares de la superficie celular (24). La replicación viral interfiere en la síntesis y función de las proteínas celulares normales, dando lugar a la lesión y, finalmente, a la muerte de la célula infectada. Los virus también pueden estimular respuestas inflamatorias que producen daño en los tejidos. A su vez son capaces también de causar infecciones latentes (25). La respuesta inmunitaria frente a los virus puede ejercerse de a través de la vía innata o adaptativa y aunque en ambas se pretende bloquear la infección y eliminar las células infectadas es bajo distintos mecanismos y mediadores como lo llevan a cabo.

La inducción del estado antiviral y de la citotoxicidad celular son los principales mecanismos efectores de la inmunidad contra los virus. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), localizados en endosomas (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) en citoplasma (RIG-I, AIM2 y cGAS) pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, en este caso, algunos de estos son material genético viral, proteínas virales o carbohidratos de la envoltura. Estos PRR al ser sensores de la infección viral e interactuar con PAMPs virales inducen la síntesis de interferones tipo

I en células infectadas, al activar factores reguladores de interferón (IRF). Al promoverse la síntesis y liberación de interferones hacia el exterior de la célula, se activan las células adyacentes de forma paracrina a través de la interacción con el receptor de interferón (IFNR). Consecuentemente, se activan las vías JAK/STAT y conducen a la transcripción del grupo de genes estimulados por interferón (ISG por sus siglas en inglés) involucrados con el establecimiento del estado antiviral (25,26).

El combate de la infección del agente viral por parte del estado antiviral se lleva a cabo principalmente por cuatro mecanismos (26):

- 1) Inhibición de la traducción de proteínas virales
- 2) Degradación intracelular de mRNA viral
- 3) Inhibición de la transcripción viral
- 4) Inhibición del ensamblaje de nuevos viriones

1.3.1 Inmunidad innata frente a los virus

En la inmunidad innata existen una gran cantidad de sistemas descritos para la defensa antiviral, entre los cuales están las barreras físicas y químicas, los péptidos antimicrobianos, la autofagia basal y la degradación proteasomal. Los mecanismos de mayor importancia contra los virus son a) la inhibición de la infección por los interferones tipo I, b) la muerte de las células infectadas por los linfocitos NK a través de la citotoxicidad mediada por granzimas y perforinas y c) inducción de apoptosis mediada por receptor y producción de citocinas inflamatorias (27). A menudo, la expresión de moléculas de MHC clase I se inhibe en células infectadas por el virus como un mecanismo de escape de los linfocitos T CD8+, por lo que es necesaria la acción citotóxica de las células NK frente a la infección viral, ya que esto funciona como estímulo para aumentar la expresión de ligandos activadores y no requieren presentación antigénica para su activación (28). Los interferones de tipo I aumentan la expresión de proteínas HLA clase I lo cual es llevado a cabo principalmente por las células dendríticas, especialmente las de tipo plasmocitoide, en respuesta a los virus (29).

1.3.2 Inmunidad adaptativa frente a los virus

Los elementos de la inmunidad humoral, así como aquellos de la inmunidad celular intervienen en los mecanismos de inmunidad adaptativa contra las infecciones virales. En cuanto a lo humoral, son los anticuerpos quienes tienen un papel fundamental en la neutralización de las proteínas externas de la cápside o envoltura viral y proteínas que participan en la adsorción al receptor celular de entrada. Los anticuerpos opsonizantes promueven la fagocitosis y permiten a las células presentadoras de antígeno realicen la presentación cruzada de antígenos virales. También desde el punto de vista de respuesta adaptativa celular la resolución de la infección viral puede llevarse a cabo por linfocitos T citotóxicos CD8+ al reconocer antígenos virales asociados a moléculas HLA clase I y la respuesta de linfocitos T cooperadores Th1 por presentación antigénica en moléculas HLA clase II (27,29).

1.4 Hiperactivación inmune y tormenta de citocinas.

En el caso del control de la propagación viral a nivel de vías respiratorias se depende de las interacciones entre las células epiteliales y las células inmunitarias, mediadas por la señalización de citocinas las cuales están como producto de la inmunidad intrínseca. Después de la eliminación viral, las células deben eliminarse para evitar la hiperactivación del sistema inmunológico y el daño tisular exacerbado. Se ha sugerido que la lesión pulmonar grave observada en algunos pacientes con infecciones agudas de vías respiratorias son consecuencia del sistema inmunológico hiperactivado más que de una eliminación viral inadecuada. ¿Cómo puede entonces una célula generar una respuesta de citocinas que sea suficiente para suprimir un patógeno o comunicar estrés celular, pero que esta no sea tan poderosa como para destruir inadvertidamente el tejido del huésped? (21,30).

Existen diversos mecanismos de respuesta inmune contra el VIA entre los cuales está aquel que desempeñan las células epiteliales del sistema respiratorio. Al interactuar con la barrera epitelial del tracto respiratorio se desencadena una respuesta que promueve un estado antiviral y pro-inflamatorio que conlleva a la resolución de la enfermedad y la pronta recuperación del paciente (30,31). Sin embargo, también se ha

reportado casos donde la respuesta antiviral y pro-inflamatoria de las células epiteliales es llevada a cabo en exceso y de manera descontrolada generándose el síndrome conocido como “tormenta de citocinas” (32) lo cual promueve el daño tisular, fibrosis y muerte del tejido teniendo a su vez como resultado un mal pronóstico para el paciente (33,34).

1.5 Tratamiento antiviral

El impacto del virus de influenza tiene efectos de alto alcance a nivel sanitario, social y financiero. Los tratamientos eficaces y las medidas de prevención, incluidas las vacunas y los antivirales, pueden llegar a ser capaces de reducir las cargas sanitarias y económicas. La vacunación actualmente es considerada como el mejor método para proteger contra la morbilidad y la mortalidad causada por el VIA. Sin embargo, la eficacia de la vacuna varía según algunos aspectos como el año, la población bajo estudio y la cepa viral. Cuando las infecciones virales son inevitables el manejo de los síntomas, secuelas y complicaciones aún se puede mejorar mediante el uso de medicamentos específicos contra el virus. Los medicamentos antivirales han sido herramientas fundamentales en la lucha contra los virus de la influenza en cada etapa del ciclo viral, desde la entrada hasta el punto de su liberación, pueden explorarse como oportunidades para el desarrollo de tratamientos antivirales dirigidos a procesos moleculares específicos (35). Son cuatro medicamentos antivirales para tratar la influenza los que son recomendados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC): fosfato de oseltamivir, zanamivir, peramivir y baloxavir marboxil (BXM) (36). Oseltamivir, Zanamivir y Peramivir son inhibidores de la neuraminidasa, proteína responsable de la salida de la partícula viral de las células por lo cual estos fármacos bloquean dicha actividad. Baloxavir es capaz de inhibir la replicación viral al inhibir a la polimerasa viral. Aunque estos medicamentos no sean del todo una cura, pueden ser efectivos cuando lo que se busca es reducir el tiempo de enfermedad y favorecer una evolución clínica rápida y sin complicaciones. Estos medicamentos reducen la carga viral en el cuerpo y desaceleran la progresión de la enfermedad. Aunque no impiden la infección, la mayoría detiene la replicación viral, permitiendo al sistema inmune innato del huésped combatir la infección de manera más efectiva. Los inhibidores de baloxavir también se recomiendan

para el tratamiento de humanos infectados con los virus de la influenza aviar, A(H5N1), A(H7N9) y A(H5N6). La aparición de cepas de influenza resistentes a los medicamentos puede hacer que los antivirales sean ineficaces (37). Los inhibidores de la proteína de matriz 2 (M2), como la amantadina utilizada en los años 60's ya no son recomendados debido a la prevalencia generalizada de mutaciones M2 que confieren resistencia. También han surgido cepas resistentes a los inhibidores de NA y resistentes a baloxavir (38).

El tratamiento de la influenza en humanos continúa siendo un reto. Los medicamentos antivirales actualmente disponibles parecen no ser suficientes para alcanzar resultados terapéuticos ideales. Persisten aún diversos obstáculos por vencer, como prolongar la duración de las respuestas inmunitarias o, en su caso también, disminuirlas, llevando a su modulación (39,40).

1.5.1 Alternativas terapéuticas

En base a las consecuencias devastadoras de pandemias por influenza y a sus brotes epidémicos, es crucial el monitoreo y estudio de esas ocasiones donde los mecanismos efectores de esta respuesta generan una pérdida de la homeostasis para así poder elucidar nuevos modelos donde se regule la secreción de citocinas y reclutamiento celular. Por lo tanto, se deben explorar enfoques antivirales directos y/o indirectos para el tratamiento de la influenza en beneficio de la salud pública y gestionar mejor así posibles pandemias futuras (41).

Diversos enfoques alternativos se pueden elucidar cuando se conocen algunos de los efectores de la respuesta inmunológica que puedan modular de cierta forma el comportamiento celular y molecular de respuesta frente al virus. Algunos ejemplos de compuestos con un potencial terapéutico frente al virus de la influenza son anakinra y glibenclamida como potenciales inhibidores de IL-1 β (42–46), así como también son considerados andrografólido, cafeína, CY-09 y MCC950 como inhibidores de la formación del complejo NLRP3 (47–52) y a su vez algunos otros como VX-767, talidomida y geranilgeraniol tienen capacidad inhibir a la caspasa-1 (53–57). Técnicas moleculares

como ensayos con RNA de interferencia y oligonucleótidos antisentido han sido también contemplados para la terapia antiviral, sin embargo, aún presentan diversos problemas de citotoxicidad, bioseguridad y una falta de especificidad (41).

1.5.2 Dietilcarbamacina como inmunomodulador

La dietilcarbamacina (1-Dietilcarbamil-1-4-metil piperazina) ha sido empleada en el tratamiento de enfermedades parasitarias tanto en seres humanos como en animales, especialmente para combatir infecciones causadas por filarias y es el agente de primera línea para la erradicación de filariasis linfática. Hewitt inicialmente descubrió y describió su efectividad como agente filaricida (58,59) para que posteriormente Frank Hawking fuera pionero en el desarrollo de la dietilcarbamacina contra la filariasis (60).

Esta sustancia ha demostrado ser efectiva contra diversas formas de filariasis en humanos, incluyendo *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Loa loa*, *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans*, *Mansonella streptocera*, *Onchocerca volvulus* y *Wuchereria bancrofti* (61). En 1947, Mazzotti realizó pruebas de la dietilcarbamacina para tratar la oncocercosis en México, aunque observó efectos secundarios graves en individuos con alta carga parasitaria de *Onchocerca volvulus*, lo que más tarde se denominó “reacción de Mazzotti”. Esta reacción se ha utilizado como un método diagnóstico específico para detectar la presencia de *O. volvulus* en personas con resultados negativos en biopsias dérmicas (62).

Químicamente, la DEC es un derivado carbamato sintético de la piperazina que puede ser sintetizado en forma de sal hidrocloreto, pamoato o dicitrato y se disuelve rápidamente en agua, figura 4. Se encuentra disponible comercialmente en forma cristalina bajo varios nombres, como Banocide o Hetrazan. El consenso terapéutico actual sugiere la administración de DEC en forma de dicitrato (63).

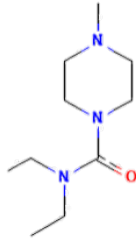


Figura 4. Formula estructural de dietilcarbamacina. Tomada de PubChem (64).

Se han realizado diversos ensayos en seres humanos con diferentes esquemas de administración oral, ajustados según la gravedad de filariasis y las posibles reacciones adversas que puedan surgir. Después de una única dosis oral de 200-400 mg de dietilcarbamacina (DEC) en voluntarios sanos, el tiempo que la DEC permanece en la sangre oscila entre 6.1 y 8.1 horas. Una dosis estándar de 200 mg de DEC produce un pico de concentración en la sangre de 1.5-2.0 $\mu\text{g/mL}$ en un lapso de 2 horas. Estudios previos indicaron que una sola dosis de 10 mg/kg de peso corporal produce un pico de concentración en la sangre de 4-5 $\mu\text{g/mL}$ en 3 horas, el cual desciende a cero a las 48 horas. La droga se distribuye por todo el cuerpo en un tiempo de 20-25 minutos. La rápida absorción a través del tracto gastrointestinal y la prontitud con la que alcanza concentraciones plasmáticas elevadas parecen ser factores contribuyentes a los severos efectos secundarios observados en individuos infectados con filarias (64).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Papel de las células epiteliales de vías respiratorias en la respuesta inmune contra el Virus de la Influenza.

Son diversos los mecanismos de respuesta inmunológica que se ejercen contra los virus respiratorios, en especial, contra el virus de la influenza (23,65,66). Se ha demostrado que incluso la respuesta innata intrínseca puede distinguirse entre las variantes BA.1 o BA.5 (Ómicron) y Delta de SARS-CoV2 lo que destaca la importancia de indagar específicamente en los mecanismos de respuesta de cada virus en específico (20,67,68). Las células epiteliales protagonizan uno de los mecanismos más relevantes en la respuesta inmune frente a algunas partículas virales como es el caso del VIA H1N1 pdm09, figura 5 (11,14,18,69). Cuando una persona inhala el virus este tiene interacción con la barrera epitelial cubierta por células que expresan residuos de ácido siálico con enlaces $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en su superficie (24,70,71) las cuales interaccionan con moléculas de superficie del virus conocidas como hemaglutinina favoreciendo su entrada al citoplasma (72). Dentro de la célula el virus es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones moleculares como por ejemplo, en el endosoma, por TLR3 o TLR7, y en citoplasma MDA5, RIG-I y MYD88 los cuales activan una serie de factores de transcripción como algunos factores reguladores de interferón (IRFs) y NF- κ B que activaran y promoverán la sobreexpresión de algunos genes (47,69,73–77). También como PRR en citoplasma esta NLRP3, proteína detectora que al formar el complejo del inflammasoma favorece la escisión sobre la pro-IL1 β generando su forma secretora, la IL-1 β . Esta última en conjunto con otras citocinas pro-inflamatoria y antivirales sintetizadas por la activación de factores de transcripción, serán secretadas al exterior (1,69,78–81).

Algunas citocinas, como las pro-inflamatorias, tendrán funciones de respuesta inflamatoria, así como de reclutamiento celular, mientras otras tendrán como característica principal su actividad antiviral. Por lo tanto, participaran en la inhibición de procesos, como la replicación del RNA viral generando una respuesta viral eficaz, la cual

se relacionara con la resolución de la enfermedad y la pronta recuperación del paciente (53,82). Como se mencionó previamente, algunos casos donde esta respuesta puede presentarse en exceso y de manera descontrolada generando la tormenta de citocinas e induciendo fibrosis y muerte de tejido, lo que clínicamente se traduce en un mal pronóstico para el paciente y se puede producir incluso la muerte (33,83–85).

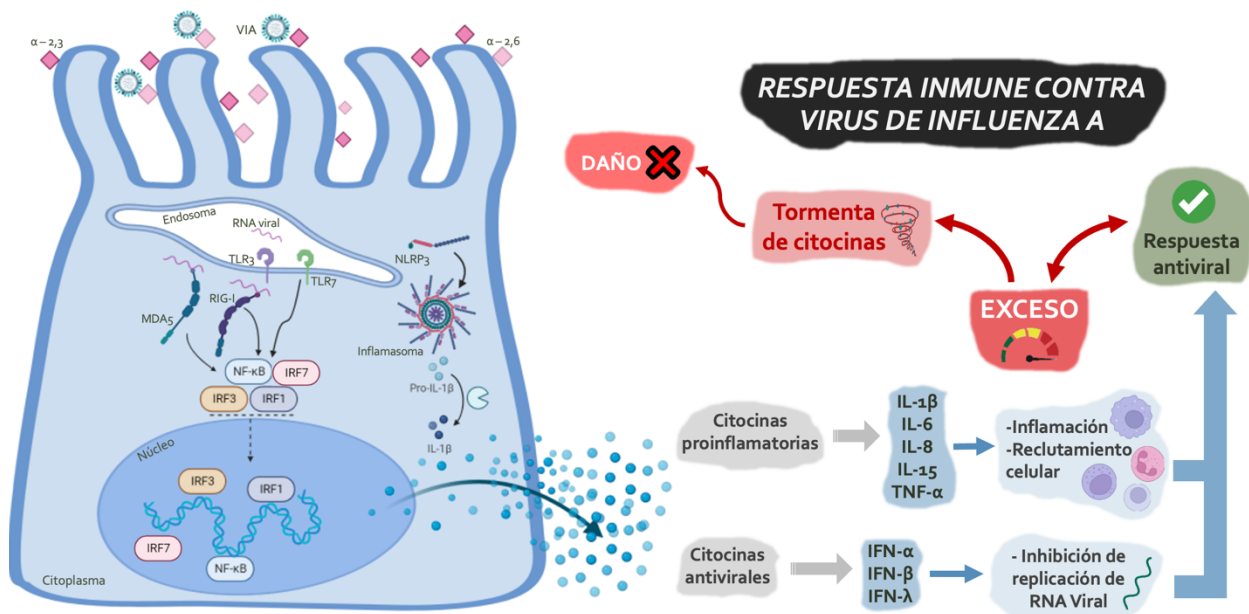


Figura 5. Respuesta inmune de células epiteliales contra el VIA.

La función de estas células en la salud y la enfermedad es importante por lo cual se estudian en cultivo de tejido humano, modelos animales y cultivos celulares ofreciendo cada uno de ellos diversas ventajas y principios que los vuelven relevantes para las ciencias de la salud (19). Un modelo ampliamente utilizado es aquel llevado a cabo en líneas celulares de epitelio alveolar basal, como son las células A549, las cuales expresan en su superficie celular moléculas de ácido siálico (86) y al ser infectadas con VIA existen aumentos en la expresión de receptores de reconocimiento de patrones moleculares como RIG-I y TLR3 a diferencia de otros como TLR7 y NOD2. Lo mismo ocurre respecto a la producción de interferón tipo III, estos se incrementan en comparación con interferones de tipo II (74). La infección del VIA H1N1pdm09 sobre las células A549 también aumenta la producción de diversas moléculas secretoras, entre ellas citocinas como IL-6 a diferencia de la infección de otros VIA H1N1 no pandémicos (87).

2.2 Dietilcarbamacina y su efecto inmunomodulador

Se tienen diversas interpretaciones del mecanismo de acción de la DEC donde algunos de ellos es su posible papel de opsonina. Lo que se contempla de mejor manera es su capacidad de inducir la movilización de las microfilarias por efecto directo sobre el sistema neuromuscular de los parásitos. Por ejemplo, en la infección por *W. bancrofti* la DEC moviliza a las microfilarias del pulmón a la circulación general. Una vez en circulación, las larvas son atrapadas por células del sistema inmune y se adhieren a las paredes de los capilares (61). Además, la DEC puede afectar directamente a los leucocitos y las plaquetas, aumentando la adherencia de las larvas a las células sanguíneas y potencialmente aumentando la capacidad del sistema inmune para eliminarlas (88).

Los puntos mencionados previamente sugieren que la dietilcarbamacina (DEC) ejerce su acción principalmente dentro del cuerpo del huésped, interactuando con su sistema inmunitario y teniendo efectos inmunomoduladores (88,89). Se ha observado que la DEC inhibe la formación de ciertos compuestos inflamatorios derivados del ácido araquidónico y puede afectar la agregación de plaquetas, lo que indica un posible efecto sobre la inflamación (90,91). Además, se ha demostrado que la DEC estimula la producción de ciertas citocinas inflamatorias *in vitro* (92). En estudios con modelos animales, se ha observado que la DEC puede aumentar la producción de anticuerpos protectores y también se ha investigado su efecto en infecciones bacterianas fúngicas, encontrando que puede disminuir la carga de microorganismos en varios órganos. En experimentos con ratones se ha visto que la DEC puede modular la respuesta inmune innata y adquirida, dependiendo de la dosis utilizada. Estos hallazgos sugieren que la DEC podría ser útil como inmunomodulador en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (90,93–97).

A nivel inmunológico se ha demostrado que la DEC juega un papel importante a través de la inhibición de la vía NF- κ B (91,96). Algunos hallazgos han destacado la participación de este compuesto farmacológico en la modulación de citocinas ocasionando una actividad anti-inflamatoria que a su vez favorece un estado anti-fibrótico (95).

De esta forma, se establece una estrecha relación entre un potencial modulador de la respuesta inmune y su reorientación hacia una nueva opción de tratamiento de una infección respiratoria viral aguda (98,99). A pesar de esto, aún quedan muchas incógnitas sin resolver en este ámbito intermedio. Hasta ahora, se han llevado a cabo investigaciones que examinan el efecto de la dietilcarbamacina en diversas enfermedades ocasionadas por patógenos, pero su papel específico en el contexto de los virus respiratorios sigue sin aclararse.

Con todo lo anterior, este trabajo se centró en analizar la acción de la DEC en la respuesta antiviral contra el VIA H1N1pdm09.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El efecto inmunomodulador de la DEC ha sido evidenciado, pero aún se desconoce su actividad en infecciones respiratorias virales. El VIA H1N1pdm09 tiene un potencial epidémico/pandémico que requiere nuevas alternativas terapéuticas, por ello se analizará la acción de la DEC sobre efectores antivirales en un modelo de células epiteliales infectadas por el VIA H1N1 pdm09.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La dietilcarbamacina incrementa efectores de la respuesta inmune antiviral en células epiteliales infectadas por el VIA H1N1pdm09.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar la acción de la dietilcarbamacina sobre efectores de la respuesta antiviral en células epiteliales infectadas con el VIA H1N1pdm09.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la dietilcarbamacina sobre efectores antivirales e inflamatorios de células epiteliales A549 infectadas con el VIA H1N1pdm09.
2. Evaluar el efecto de la dietilcarbamacina sobre el título viral de células epiteliales infectadas por el VIA H1N1pdm09.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Líneas celulares

Las células MDCK (NBL-2; ATCC, Manassas, VA, USA) fueron cultivadas a 37°C y 5% CO₂ en medio EMEM suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) al 10%. Las células A549 (CCL-185; ATCC, Manassas, VA, USA) se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ en medio F-12K suplementado con FBS al 10%. A todos los medios de cultivo se les adicionó 1% de disolución antibiótica-antimicótica (10,000 U Penicilina, 10 mg estreptomicina y 25 µg/mL anfotericina B) (Sigma-Aldrich A5955) y fueron filtrados en membranas con poros de un tamaño de 0.22 µm de diámetro (Millex-GP; Merck Millipore Ltd.).

6.2 Virus

Se propagó el virus de la influenza A/Virginia/ATCC1/2009 en células MDCK en medio de infección (IVGM) (MEM, 1 µg/mL de tripsina TPCK, 10mM de HEPES y 0.125% de BSA) hasta observar un efecto citopático y citolítico en más del 90% de las células (2-5 días). Después de la cosecha, los debris celulares fueron precipitados por centrifugación (10,000 xg por 10 minutos a 4°C). Para remover factores solubles de origen celular el IAV fue concentrado y parcialmente purificado utilizando un filtro centricon de peso molecular 100,000 Da (Millipore, Billerica, MA). El virus fue titulado con la técnica de la dosis infectiva de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) y congelado en alícuotas de un solo uso a -80°C.

6.3 Ensayos de viabilidad celular

Se cultivaron células A549 en placa de 96 pozos a una densidad de 0.5x10⁶ células/mL y se incubó a 37°C y 5% CO₂ hasta obtener una confluencia mayor al 90%. Se realizó un cambio de medio de cultivo con medio F-12K al cual se le adicionó distintas concentraciones de citrato de dietilcarbamacina (DEC) las cuales fueron de 2, 20, 50, 100, 150 y 200 µg/mL (Sigma Aldrich, D8765), el medio de cultivo sin DEC fue utilizado como control negativo y el medio de cultivo con Triton X100 (Sigma Aldrich, T8787) como

control positivo de citotoxicidad. Las células fueron incubadas durante 24 y 48 horas, respectivamente. Los ensayos fueron realizados por quintuplicado en tres experimentos independientes. Terminada la incubación, se observó la morfología por microscopía de contraste de fases y posteriormente el sobrenadante fue removido y se adicionó el reactivo de marcaje del Cell Proliferation Kit I (MTT) (Sigma Aldrich, 11 465 007 001) para adicionar después de 4 horas de incubación a 37°C en 5% CO₂ el buffer de solubilización a cada uno de los pozos e incubar toda la noche para posteriormente determinar la absorbancia a 590nm por espectrofotometría en un lector de placas GloMax® (Mod. E9032 Promega, Madison, WI).

6.4 Modelo de infección

Previamente el grupo de trabajo ya ha implementado en modelos de infección viral una MOI=1 (86) donde para ello es necesario observar el efecto citopático que ejerce el virus sobre la monocapa. Las células A549 fueron cultivadas en placa de 6 pozos e incubadas durante 24 horas para alcanzar una confluencia del 90%. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y las células fueron infectadas con virus de influenza a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Después de 2 horas de adsorción, se removió el inóculo y después de un lavado se añadieron a cada pozo 2,000 µL de medio IVGM sin DEC y con DEC a concentraciones de 2, 20 y 100 µg/mL, respectivamente. Para el grupo MOCK los cultivos fueron tratados bajo las mismas condiciones y reactivos que los grupos de infección con la excepción de que estos nunca fueron expuestos al virus de influenza. Adicionalmente, se trató con DEC (20 µg/mL) un grupo sin infección. Los grupos del modelo experimental se mantuvieron en incubación por 24 y 48 horas, respectivamente, después se recuperaron los sobrenadantes para determinación de citocinas y título viral. Las alícuotas de cada uno de los grupos fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Por otro lado, las células fueron utilizadas para el aislamiento de RNA. Los ensayos fueron realizados por triplicado en dos experimentos independientes.

6.5 Análisis multiplex de citocinas

El ensayo multiplex fue realizado para 6 citocinas (IL-6, IL-10, IL-1β, IL-15, IL-8 y RANTES) utilizando el Bio-Plex Pro-Human proinflammatory Cytokine kit (Premezclado)

(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) comenzando con 50 μ L de sobrenadante de cultivo celular de cada grupo de estudio. Todo el procedimiento fue realizado acorde al protocolo del fabricante. El análisis de la placa se realizó en Bio-Plex 200 mediante el software Bio-Plex Manager y Data Pro tomando en cuenta los límites de detección y cuantificación para cada citocina.

Tabla 3. Límites de detección y cuantificación de citocinas.

Analito	Límite de detección, pg/mL	Límite de cuantificación, pg/mL
IL-1 β	4,988	0.25
IL-6	5,823	0.36
IL-8	15,080	0.92
IL-10	17,897	1.09
IL-15	319,328	19.49
RANTES	15,709	0.96

6.6 Expresión de genes

El RNA total fue aislado utilizando el kit Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) y almacenado a -80°C hasta su uso. La concentración de RNA y cDNA fueron determinadas mediante espectrometría empleando un Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones de RNA obtenido fueron de 285 ng/ μ l \pm 73.54 (Media \pm desviación estándar) con relación de las absorbancias A260/280 se encontraron en 2.08 \pm 0.0104. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción con M-MLV (Cat. #1708891, Biorad) en el termociclador PTC-200 (DNA Engine®, MJ Research). La concentración de cDNA obtenido se encontró en el rango de 1273 ng/ μ l \pm 435.8 (Media \pm desviación estándar), mientras la relación de absorbancias A260/280 de 1.83 \pm 0.0116. La RT-qPCR fue realizada utilizando iQ SYBR Green Supermix (Cat. #170-8882, Biorad, Hercules, CA) ó IQ Supermix (Cat. #170-8862, Biorad, Hercules, CA), primers específicos (Alpha DNA, Montreal, Quebec) y/o sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) en un termociclador CFX96 (Biorad, Hercules, CA). Se realizó la expresión relativa de mRNA de los genes TLR3 (TLR3 F 5' AAATTAAGAGTTTTCTCCAGGGTGTT; TLR3 R 5'

ATTCCGAATGCTTGTGTTTGC), NLRP3 (NLRP3 F: 5' CTTCTCTGGATGAGGCCCAAG; NLRP3 R: 5' GCAGCAAAGCTGGAAAGGAAG), DDX58 (RIG-I; Hs01061431_m1), IFNL1 (Hs00601677_g1), MYD88 (Hs01573837_g1), NF- κ B1 (Hs00765730_m1), IFNB1 (Hs01077958_s1). Se utilizó GAPDH (Hs02758991_g1) como gen endógeno. La expresión relativa se realizó empleando el método de Livak, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (100).

6.7 Cuantificación de TNF α por inmunoensayo ligado a enzima

Se utilizaron alícuotas de sobrenadantes previamente almacenadas a -80°C para la determinación cuantitativa de TNF α usando un kit ELISA humano (TNF Alpha Human Uncoated ELISA kit; 88-7346-88, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.8 Título viral

Se cultivaron células MDCK y se incubaron a 37°C y 5% CO_2 hasta alcanzar confluencia mayor al 90%. Los cultivos fueron infectados con las diluciones de los sobrenadantes de cada grupo de estudio por 2 horas. Las placas se lavaron y se les añadió medio IVGM para incubar durante 72 horas a 37°C . Posteriormente, se observaron las placas líticas y se eliminó el contenido suspendido en el medio a través de lavados y se llevó la determinación del título viral utilizando el método TCID₅₀; Luego las monocapas se fijaron con paraformaldehído al 4% y tiñeron con cristal violeta para observar unidades formadoras de placas líticas.

6.9 Estrategia general

Como estrategia general se partió de un stock viral el cual se tituló en células MDCK para posteriormente tener la concentración viral e infectar células A549 a una MOI = 1. El modelo de infección se llevó a cabo en base a seis grupos experimentales donde tres de ellos son controles: sin infección, con infección y con DEC. Los otros tres grupos de células infectadas son sometidos a concentraciones de 2, 20 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pasados los tiempos de 24 y 48 horas bajo condiciones de 37°C y 5% CO_2 se separaron células y sobrenadantes para evaluar la expresión de genes por RT-qPCR y de citocinas por ensayos luminex y ELISA. La posterior titulación fue llevada a cabo tomando

sobrenadante de cada cultivo para determinar unidades formadoras de placas líticas y dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50%, figura 6.

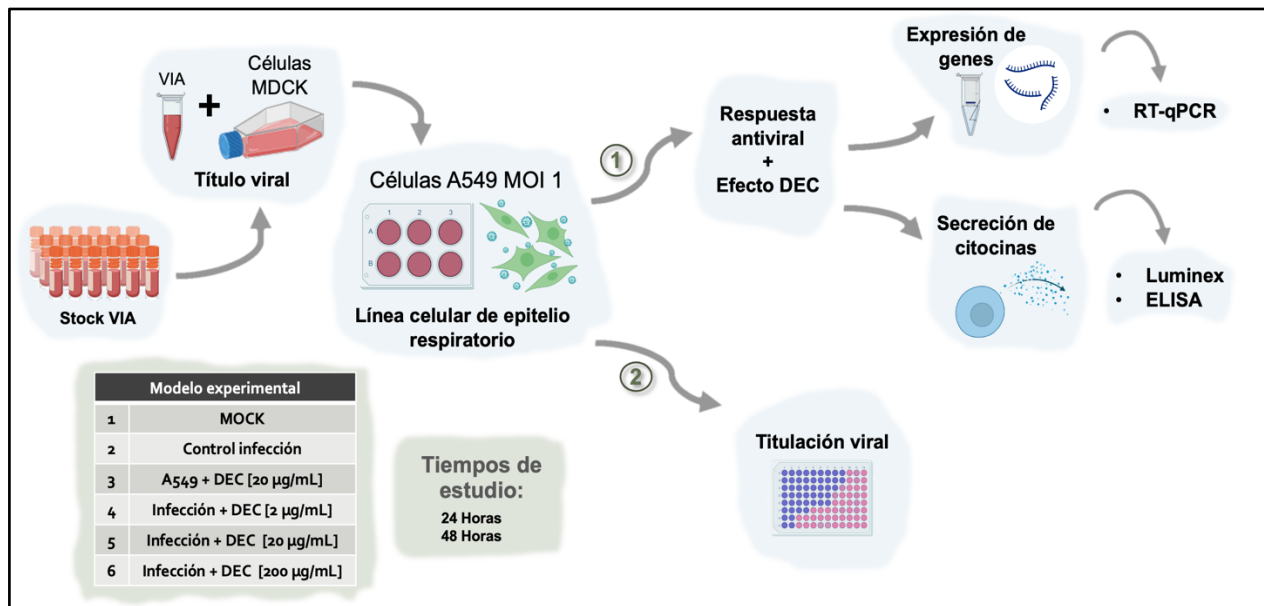


Figura 6. Esquema de la estrategia general.

6.10 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Posterior a ello se procedió a realizar el análisis de ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey (para aquellos datos paramétricos) o el análisis Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn (para aquellos datos no paramétricos). Los cálculos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 9.0.1 para MacOS (San Diego, California, EE. UU.). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Viabilidad de células A549 tratadas con DEC.

Primeramente, se evaluó la viabilidad de las células A549 frente a la DEC. Dado que se investiga el potencial inmunomodulador de este fármaco en una infección, resulta fundamental asegurar que no ejerza un efecto citotóxico sobre las células a evaluar, dado que esto podría comprometer su idoneidad para dicho propósito. Las células A549 fueron incubadas durante 24 y 48 horas con diversas dosis de DEC, se obtuvieron imágenes representativas, en donde los grupos de células tratadas con DEC a concentraciones de 2, 20, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente mantuvieron la monocapa integra sin ninguna observación morfológica sugestiva de daño celular lo cual coincide con el grupo tratado con PBS. Por otro lado, los grupos tratados con DEC a concentraciones de 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron cambios morfológicos que resultan coincidir con daño o muerte celular, figura 7.

Una vez realizado el ensayo de MTT y previo a su lectura espectrofotométrica se observó de manera visual los cambios colorimétricos en cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular donde el color azul de cada pozo concuerda con el principio del ensayo, al ser esta tonalidad se relaciona con la producción de cristales de formazan, por lo tanto denota actividad metabólica. Por otro lado, los grupos de Tritón X100 y de DEC 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron un color amarillo indicando de que los cristales de MTT no pudieron ser metabolizados, figura 8A. Se obtuvieron los resultados de lecturas espectrofotométricas en lector de placas a una longitud de onda de 590 nm. El porcentaje de viabilidad de la concentración de 200 microgramos por mililitro fue similar a la viabilidad del grupo de Triton X100, teniendo estos dos grupos, diferencias significativas entre el resto de los grupos, figura 8B. En el grupo de DEC 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observó afectada la viabilidad, pero las células mostraron cambios morfológicos al microscopio, por lo tanto se decidió trabajar con las concentraciones de DEC a 2, 20 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los posteriores ensayos.

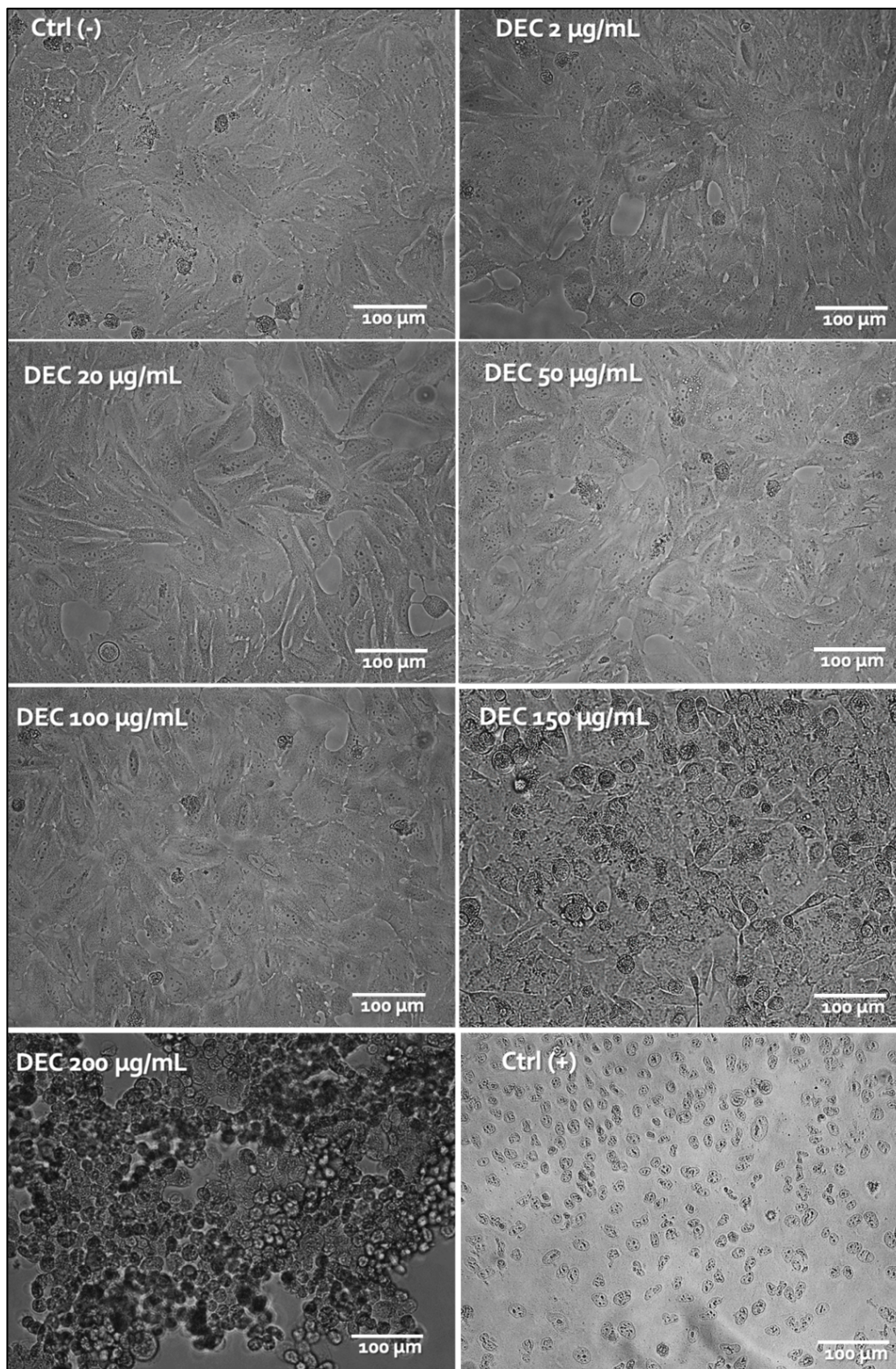


Figura 7. Imágenes representativas de la monocapa de cultivo de células A549 + DEC. Tomadas con el microscopio de contraste de fases Fluid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). Ctrl (-) = PBS, Ctrl (+) = Triton X100.

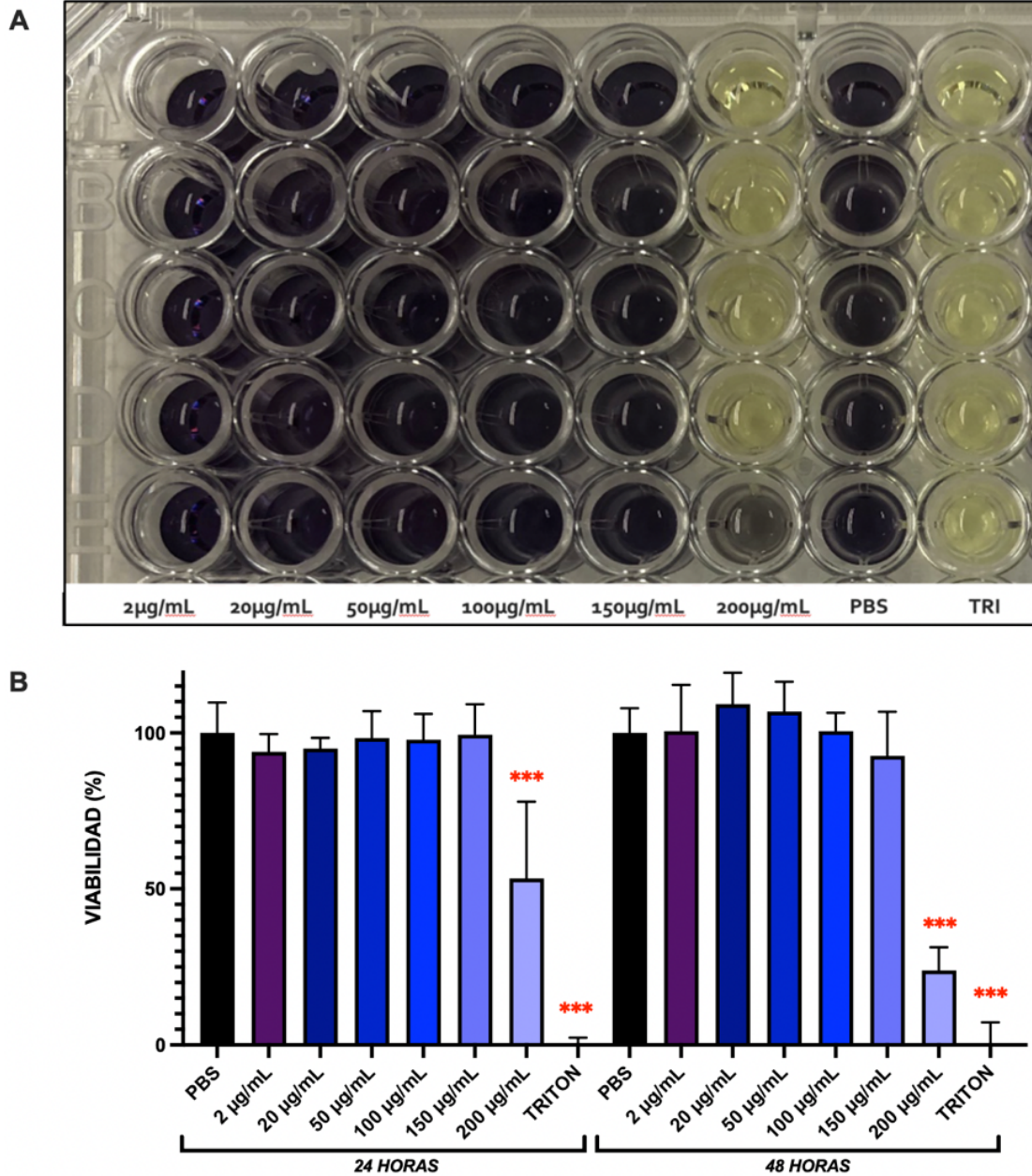


Figura 8. Ensayo de citotoxicidad de la DEC en células A549. A) Placa de cultivo de células A549 + DEC en ensayo de MTT previo a su lectura espectrofotométrica. El color azul en cada pozo se relaciona con una mayor actividad metabólica mientras, aquellos pozos de coloración amarilla son por los cristales de MTT que no pudieron ser metabolizados. B) Porcentaje de viabilidad obtenido a partir de las lecturas espectrofotométricas, n=5 por grupo en 3 experimentos independientes. One Way ANOVA, post hoc Tukey *** $P \leq 0.0001$.

7.2 Determinación de la multiplicidad de infección a través de titulación viral

Para el modelo experimental de multiplicidad de infección igual de 1 (MOI = 1) se realizaron el ensayo de dosis infectiva de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) y el ensayo de unidades formadoras de placas líticas (PFU Assay, por sus siglas en inglés) observando por microscopia de contraste de fases la monocapa celular para evaluar su integridad, figura 9. Posterior a ello se obtuvieron los valores de TCID₅₀/mL = 2.16x10⁹ y UFP/mL = 1.49x10⁹. Para ajustar una MOI=1 entonces se contemplan 0.6711 μL por cada millón de células.

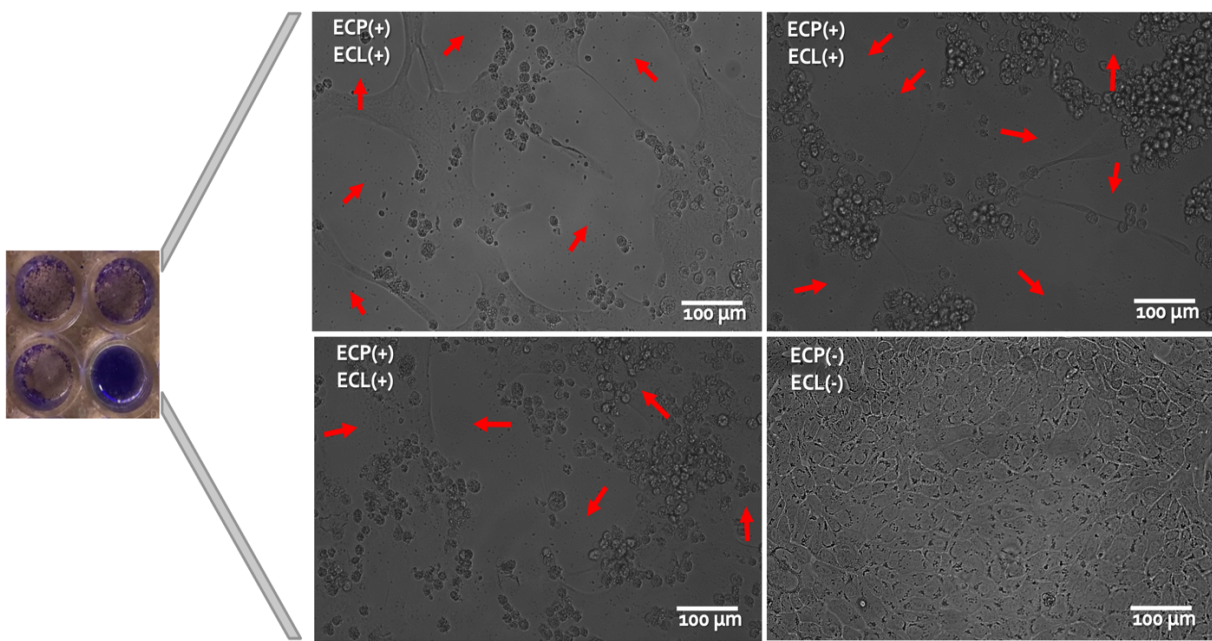


Figura 9. Imágenes representativas de la monocapa celular infectada con stock viral. Las flechas rojas indican las unidades formadoras de placas líticas características de una actividad por parte del virus de la influenza sobre las células MDCK, n = 5 por grupo en 3 experimentos independientes. ECP = Efecto citopático. ECL = Efecto citolítico.

7.3 Análisis de la expresión de genes en cultivos de células epiteliales tratados con distintas concentraciones de dietilcarbamacina

La expresión de genes se evaluó mediante la técnica de RT-qPCR, entre los genes evaluados se encuentran aquellos relacionados con la respuesta antiviral del sistema inmunológico llevando a cabo el análisis de los resultados por medio del método de Livak

($2^{-\Delta\Delta C_t}$). La expresión de receptores de reconocimiento de patrones como RIG-I (DDX58), figura 10A-B; y TLR3, figura 10C-D a las 24 y 48 horas no mostraron diferencias significativas entre ninguno de sus grupos ($P>0.05$).

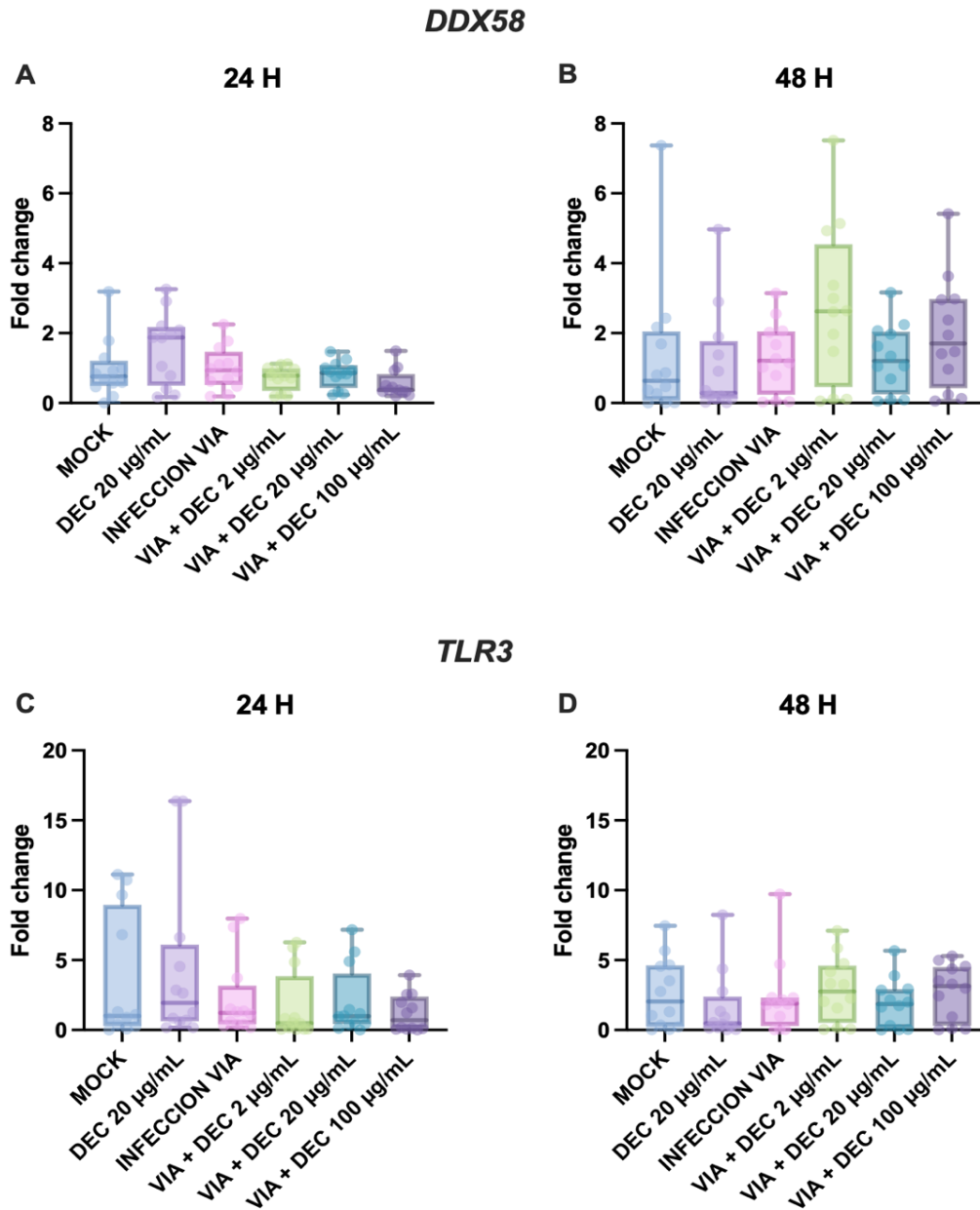


Figura 10. Niveles de expresión de genes clave relacionados con receptores de reconocimiento de patrones en la respuesta inmune. Gráficas de expresión de DDX58 a las A) 24 y B) 48 horas y de TLR3 a las C) 24 D) y 48 horas. Kruskal-Wallis test con comparación múltiple de Dunn. n=3 de cada grupo por tres experimentos independientes.

La expresión de genes tales como MYD88, NLRP3 y NFκB1, los cuales están relacionados a la promoción de la activación de vías de señalización proinflamatorias y antivirales mediados por receptores tipo toll y citocinas. En el modelo experimental MYD88 se encontró elevada su expresión en el grupo infección con respecto al MOCK a las 24 horas ($P \leq 0.05$), figura 11A. El aumento de la expresión también fue observado en el grupo tratado con DEC a 20 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al MOCK ($P \leq 0.01$). En los grupos infectados y tratados con dietilcarbamacina no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a excepción del grupo infectado y tratado con DEC a 100 $\mu\text{g/mL}$, el cual presenta una menor expresión en comparación al grupo de infección ($P \leq 0.05$) y al grupo de DEC ($P \leq 0.01$). A las 48 horas no se aprecian diferencias significativas en la expresión de MYD88 en ninguno de los grupos ($P > 0.05$), figura 11B.

Para la expresión de NLRP3 a las 24 horas no se observan diferencias significativas en los grupos ($P > 0.05$), figura 11C. A las 48 horas se observa ya un aumento en la expresión del grupo infección con respecto al MOCK ($P \leq 0.05$) indicando un aumento en la expresión génica de NLRP3 lo cual no se aprecia respecto a los otros grupos indicando no tener diferencias ($P > 0.05$) por parte de los grupos infectados y tratados con DEC con respecto al grupo MOCK, figura 11D.

La expresión del gen NFκB1 a las 24 horas, mostró un aumento en los grupos DEC ($P \leq 0.01$), Infección ($P \leq 0.05$) y VIA + DEC20 ($P \leq 0.05$) con respecto al MOCK, figura 11E. A las 48 horas las diferencias entre los grupos mencionados ya no se observan teniendo solamente un aumento en la expresión de NFκB1 en el grupo VIA + DEC2 con respecto al grupo DEC, figura 11F.

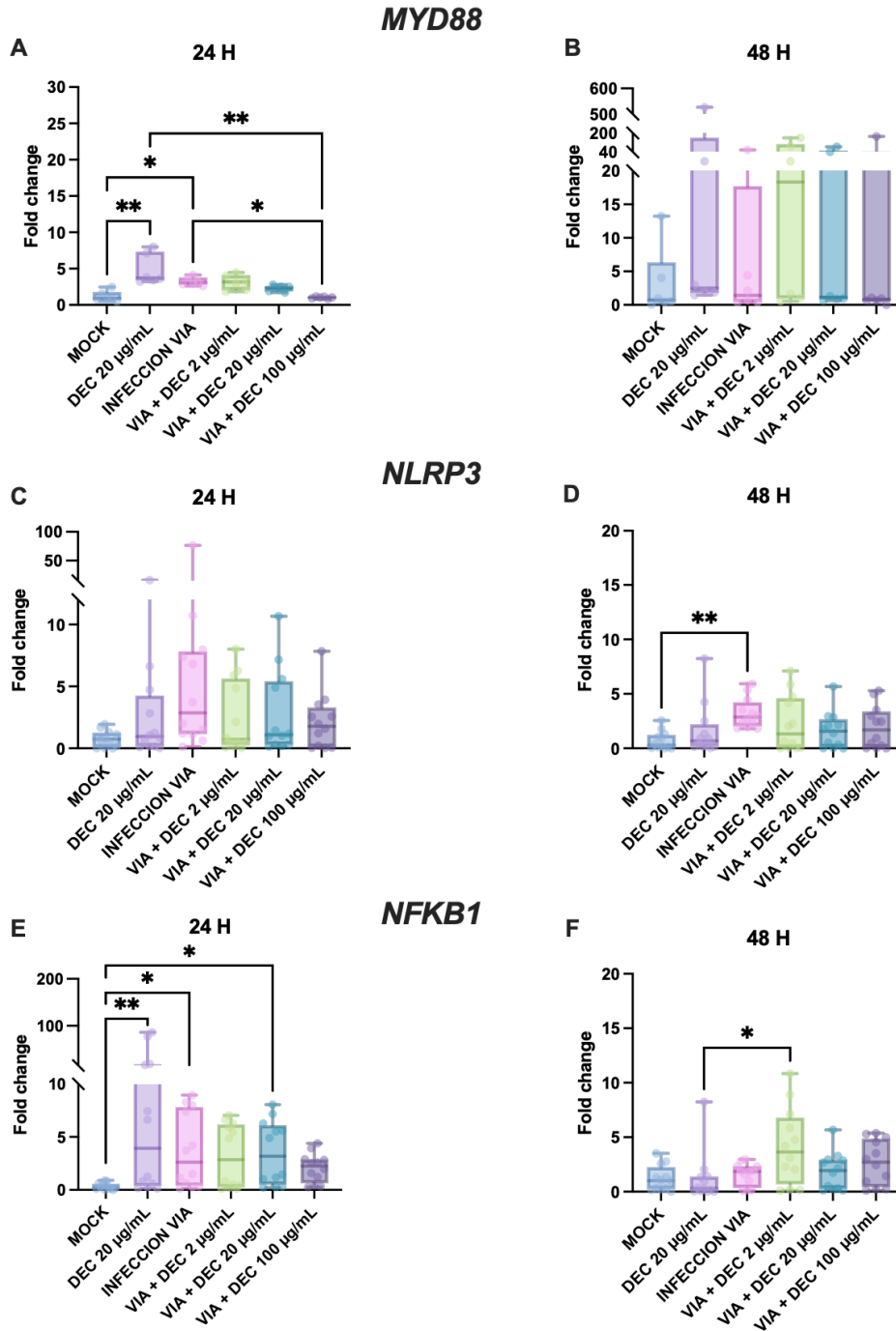
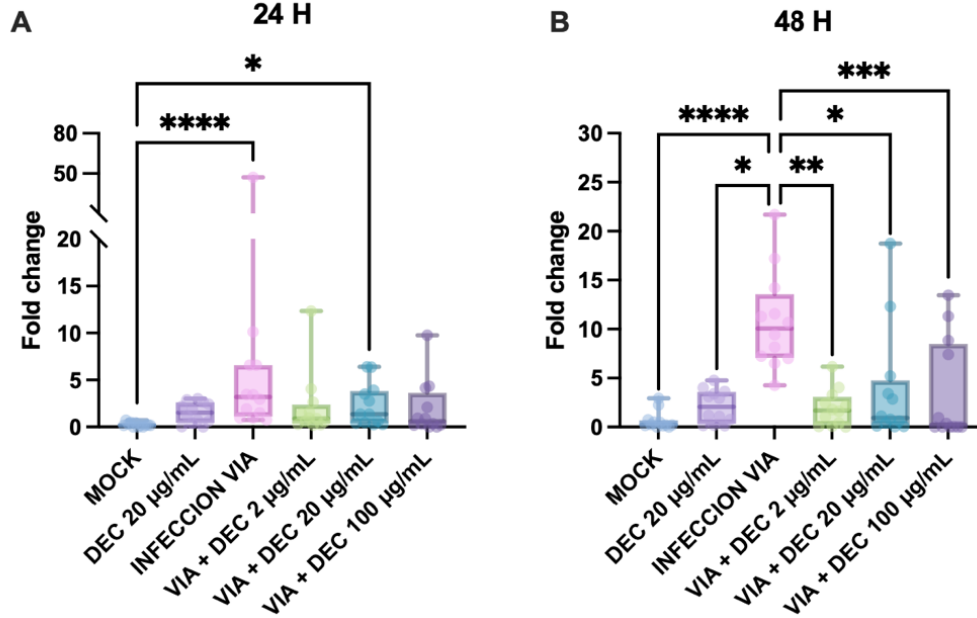


Figura 11. Niveles de expresión de genes clave relacionados con vías de señalización de la respuesta inmune. Se muestran las gráficas de MYD88 a las A) 24 y B) 48 horas así como de NLRP3 a las C) 24 y D) 48 horas y de NFKB1 a los mismos tiempos respectivamente E) y F). Kruskal-Wallis test con comparación múltiple de Dunn, $*P \leq 0.05$ $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, $****P \leq 0.0001$. $n=3$ de cada grupo por tres experimentos independientes.

Para evaluar la respuesta antiviral por parte de las células epiteliales se evaluó el nivel de expresión de genes de respuesta de interferones tipo I y tipo III, figura 12. En el caso de la respuesta de interferón de tipo I se evaluó IFNB1 a las 24 horas con lo cual el grupo infección ($P \leq 0.0001$) y el grupo VIA + DEC20 ($P \leq 0.05$) tuvieron una mayor expresión al ser comparados con el MOCK, figura 12A. El resto de los grupos no tuvieron diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$). A las 48 horas el grupo infección tiene una mayor expresión que el resto de los grupos debido a la menor expresión del MOCK ($P \leq 0.0001$) y del resto de los grupos VIA + DEC2 ($P \leq 0.01$), DEC20 ($P \leq 0.05$) y DEC100 ($P \leq 0.001$) y grupo tratamiento de DEC20 ($P \leq 0.05$), figura 12B.

Al evaluar la respuesta de interferón de tipo III se tomó evaluación de la expresión génica de IFNL1 donde a las 24 horas se observó un aumento en la expresión de los grupos VIA + DEC2 ($P \leq 0.0001$), VIA + DEC20 ($P \leq 0.001$) y VIA + DEC100 ($P \leq 0.01$) con respecto al MOCK, figura 12C. El grupo infección también mostró un aumento significativo ($P \leq 0.001$) contra el MOCK y además de lo anterior, otra diferencia destacable fue la que se logró observar en el grupo DEC20 ($P \leq 0.001$) al tener una mayor expresión con respecto al MOCK. A las 48 horas, las diferencias significativas entre los grupos se mantienen entre los grupos VIA + DEC2 ($P \leq 0.05$), VIA + DEC20 ($P \leq 0.05$), VIA + DEC 100 ($P \leq 0.0001$), grupo infección ($P \leq 0.001$) y grupo DEC20 ($P \leq 0.0001$) con respecto al MOCK, figura 12D.

IFNB1



IFNL1

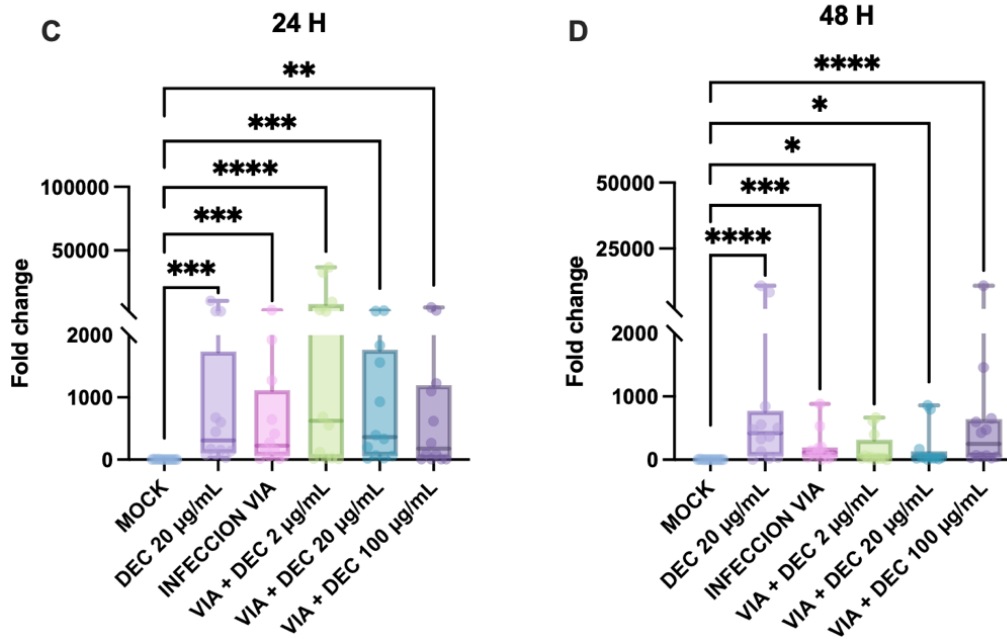


Figura 12. Niveles de expresión de genes clave relacionados con la respuesta de interferones tipo I y III. Se muestran las gráficas de IFNB1 a las A) 24 y B) 48 horas así como de IFNL1 a las C) 24 y D) 48 horas Kruskal-Wallis test con comparación múltiple de Dunn. n=3 de cada grupo por tres experimentos independientes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

7.4 Análisis de la concentración de citocinas en sobrenadantes de cultivos de células epiteliales tratados con distintas concentraciones de dietilcarbamacina.

Para evaluar el efecto de la dietilcarbamacina sobre efectores inflamatorios de la respuesta antiviral se evaluó la secreción de citocinas que participan en la respuesta pro-inflamatoria como es el caso de la IL-1 β , IL-6, IL-15 y TNF- α así como su también fue evaluada la secreción de IL-10, una citocina con propiedades de respuesta anti-inflamatoria. Para el caso de la IL-1 β y la IL-10 se obtuvieron valores por debajo de los límites de detección de cada analito por lo que no fue posible el análisis de estos.

Al evaluar la secreción de TNF- α a las 24 y 48 horas no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ninguno de los grupos del modelo experimental establecido en células epiteliales, figura 13A,B. IL-6 es otra citocina con capacidad de ser sintetizada y secretada en respuesta a TNF- α , IL-1, y a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). En la evaluación de su secreción a las 24 y 48 horas no se observaron diferencias entre los grupos ($P > 0.05$), figura 13C,D. Para la IL-15 a las 24 horas se observaron diferencias significativas en el grupo VIA + DEC2 con respecto al resto de los grupos VIA + DEC20 ($P \leq 0.001$), VIA + DEC 100 ($P \leq 0.001$), grupo infección ($P \leq 0.05$), grupo DEC20 ($P \leq 0.001$) y MOCK ($P \leq 0.01$) debido a que en este grupo las concentraciones obtenidas para esta citocina fueron bajas, figura 13E. A las 48 horas no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$), figura 13F. También se contemplaron los niveles de la secreción de citocinas pertenecientes a la familia de las quimiocinas como RANTES (CCL5) y también IL-8 (CXCL8) ya que ambas contribuyen y son necesarias para una respuesta inmune apropiada donde se busca contrarrestar la expansión viral.

Para RANTES a las 24 y 48 horas no se observan diferencias significativas entre cada uno de los grupos ($P > 0.05$), figura 14A,B. IL-8 muestra a las 24 horas diferencias significativas a través del aumento en la secreción de esta citocina en el grupo infección ($P \leq 0.05$) y en el grupo VIA + DEC20 ($P \leq 0.05$) con respecto a los grupos MOCK y VIA + DEC2 los cuales presentan concentraciones menores de IL-8 en sobrenadante, figura 14C. A las 48 horas ya no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$), figura 14D.

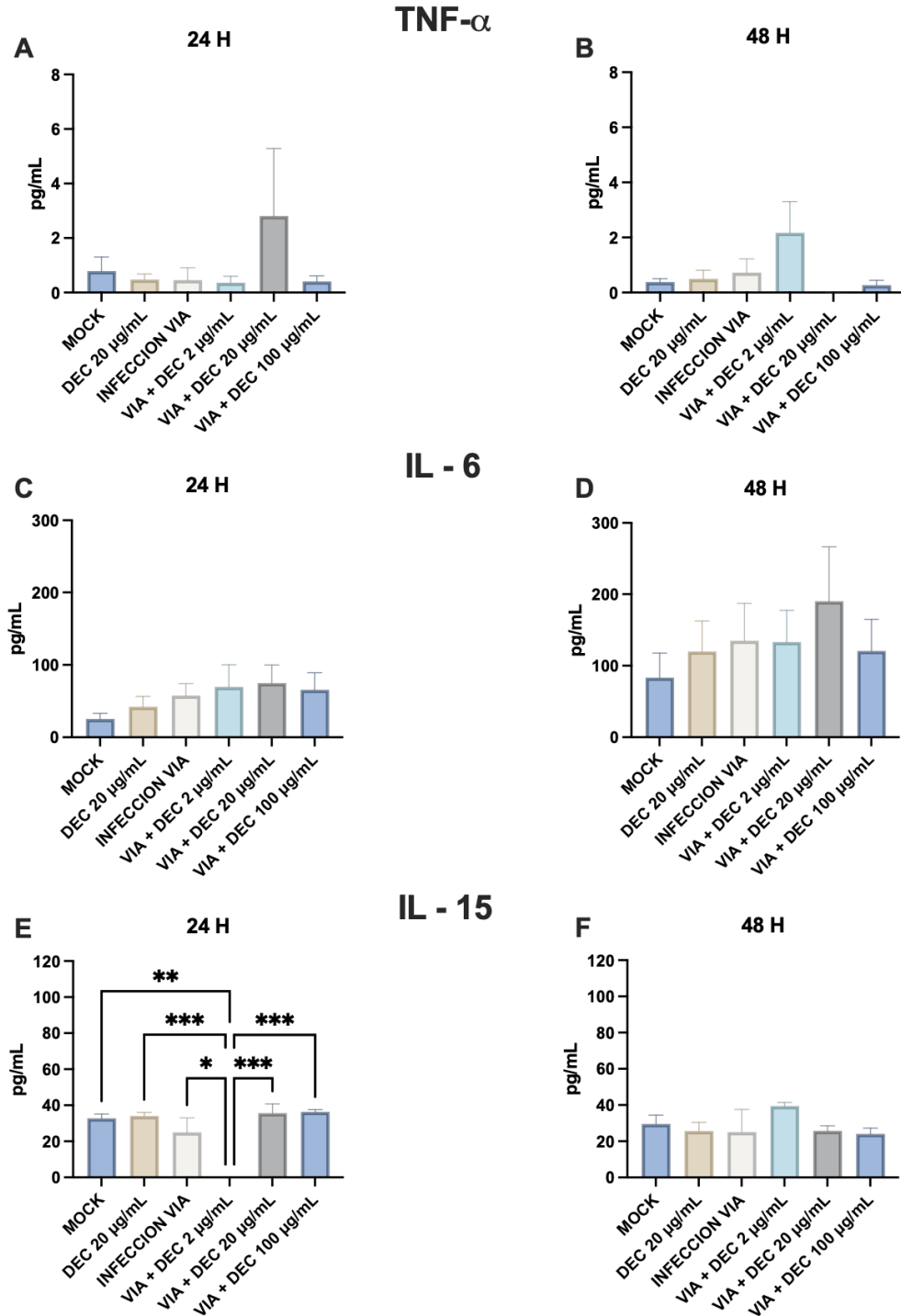
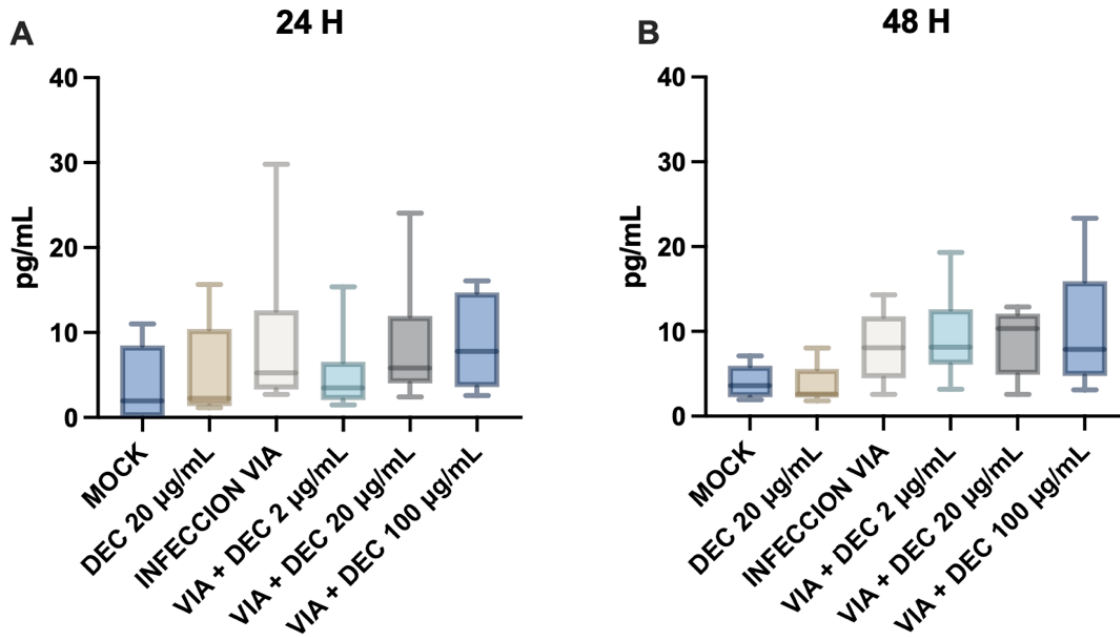


Figura 13. Niveles de secreción de citocinas proinflamatorias. Se muestran las gráficas de TNF- α a las A) 24 y B) 48 horas así como de IL-6 a las C) 24 y D) 48 horas y de IL-15 E) y F) a los mismos tiempos respectivamente. One Way ANOVA con comparación múltiple de Tukey. n=3 de cada grupo por tres experimentos independientes. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

RANTES



IL - 8

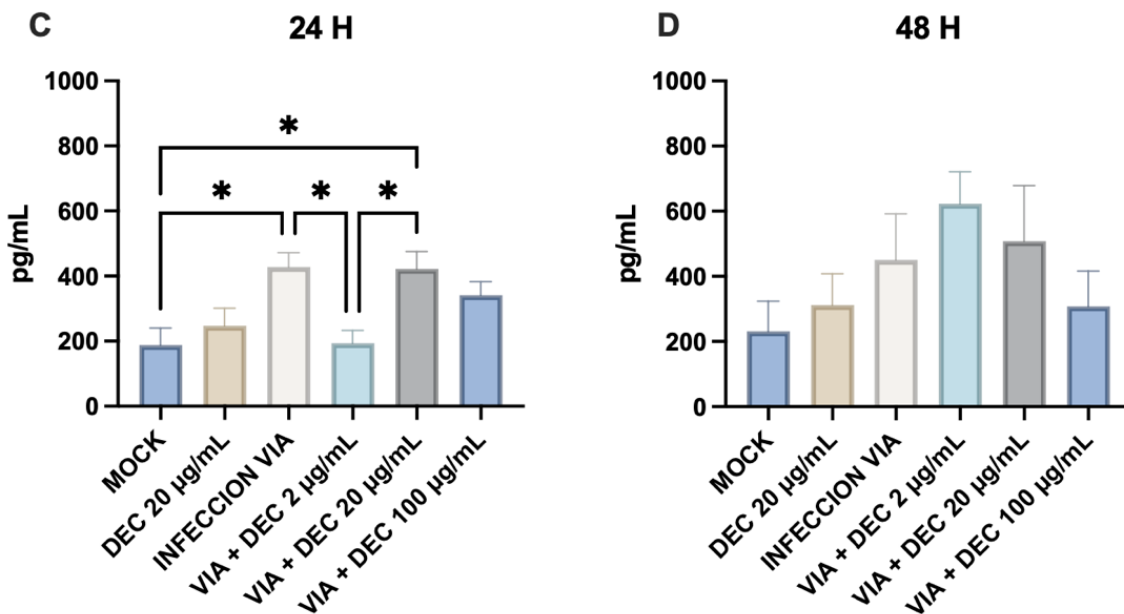


Figura 14. Niveles de secreción de citocinas pertenecientes a la familia de las quimiocinas. Gráficas de RANTES a las A) 24 y B) 48 horas. Kruskal-Wallis test con comparación múltiple de Dunn. Gráficas de IL-8 a los tiempos de C) 24 y D) 48 horas. One Way ANOVA con análisis múltiple de Tukey. $n=3$ de cada grupo por tres experimentos independientes, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, $****P \leq 0.0001$.

7.5 Análisis del efecto de la DEC en el título viral.

Para analizar el efecto de la DEC sobre el título viral de células infectadas por el VIA se tomaron los sobrenadantes de los cultivos de cada grupo de estudio, los cuales se realizaron ensayos de TCID₅₀. En los grupos MOCK y DEC no se observaron unidades formadoras de placas líticas dado que no hay presencia de infección. Los sobrenadantes de los grupos de infección, VIA + DEC 2µg/mL, VIA + DEC 20µg/mL y VIA + DEC 100µg/mL fueron evaluados a las 24 y 48 horas, figura 15. Después de 24 se observó una disminución del título viral en el grupo VIA + DEC 2µg/mL con respecto al grupo infección ($P \leq 0.05$), figura 15A. Para el grupo VIA + DEC 20µg/mL se observó un comportamiento de menor título viral al grupo infección, sin embargo no se muestran diferencias significativas, pero se encontró diferencia significativa con el grupo VIA + DEC 100µg/mL ($P \leq 0.05$) que presentó un aumento del título viral con respecto a los otros dos grupos de infección y tratamiento con DEC. Resultados similares son observados a las 48 horas, figura 15B.

TÍTULO VIRAL DE SOBRENADANTES

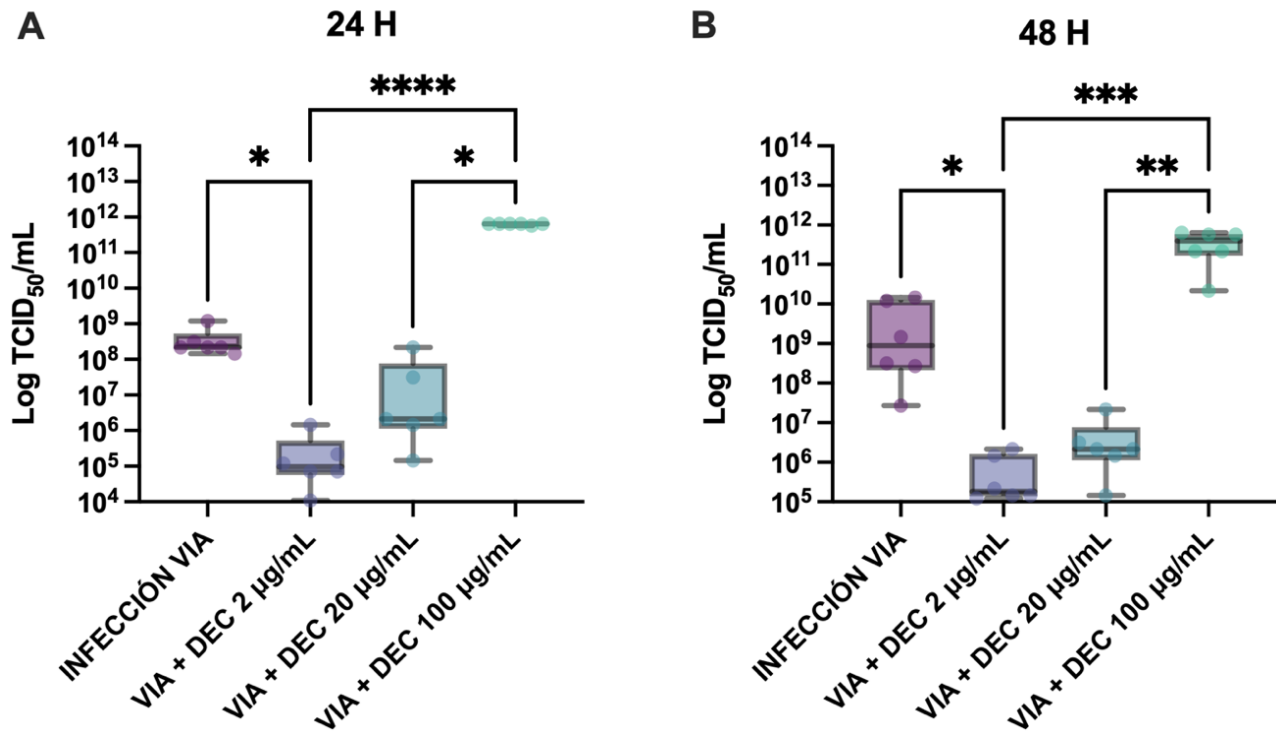


Figura 15. Título viral de sobrenadantes. Las gráficas a las A) 24 y B) 48 horas expresan el título viral en TCID₅₀/mL. Kruskal-Wallis test con comparación múltiple de Dunn. n=3 de cada grupo en 3 experimentos independientes por octuplicado (8 ensayos), * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

CAPITULO 9

DISCUSIÓN

La DEC es un fármaco con un bajo costo y un alto índice terapéutico. Esto último le otorga un amplio margen de seguridad al emplearse como tratamiento para la filariasis linfática en humanos; Pero poco se conoce del efecto citotóxico de la DEC en la línea celular A549 donde a través de bioensayos previos (64) en otras líneas celulares se emplean valores standard de DEC de 20 μ M para IC50 la cual es una dosis similar a las utilizadas en este trabajo ya que se establecieron los rangos de las concentraciones a evaluar de DEC (2, 20, 50, 100, 150 y 200 μ g/mL). No se observó citotoxicidad ni cambios morfológicos asociados a daño en las concentraciones de DEC 2, 20, 50, 100 μ g/mL. A las concentraciones de 150 y 200 μ g/mL se observaron cambios en la morfología, en base a la observación de microscopia de contraste de fases se aprecia una morfología de células parecidas a guijarros o “pebble-like cells” que indica una menor integridad de la monocapa. La actividad metabólica determinada por el ensayo MTT mostró una mayor citotoxicidad sobre las células tratadas con 200 μ g/mL de DEC, si bien, la concentración de 150 μ g/mL no afecto viabilidad esta mostró una distinta morfología.

Evaluar la expresión de genes relacionados con receptores de reconocimiento de patrones (RIG-I y TLR-3), rutas de señalización (MYD88, NF- κ B) y NLRP3 (inflammasoma) son de gran importancia cuando se evalúa la respuesta antiviral e inflamación por parte de las células epiteliales. RIG-I y TLR3 son parte de la primera línea de defensa contra los virus de RNA ya que sus propiedades mecánicas cuidadosamente coordinadas les permiten llevar a cabo una respuesta contra patógenos virales mortales, manteniendo al mismo tiempo una selectividad que le impide volverse contra su huésped (101,102). Aun cuando TLR-3 y RIG-I no muestran diferencias en su expresión, se distingue un aumento transitorio en la expresión de MYD88 a las 48 horas con respecto al MOCK el cual es capaz de activar el estado antiviral (103,104) que se ve reflejado con la activación de la vía NF- κ B (96,105) y de NLRP3 (106,107) donde a través del aumento de la expresión de estos genes en el grupo infección se ve evidenciada la actividad efectora antiviral. Estos interruptores moleculares pueden llegar a ser inhibidos de diversas formas como

puede ser el mismo RNA propio (108) o también algunas otras moléculas como CEACAM-1 expresada de forma endógena por células epiteliales (109). Existen también algunos otros inhibidores que aumentan su expresión en poblaciones celulares tanto epiteliales como inmunológicas una vez que hay daño celular (110). Son una diversidad de receptores los que reconocen el RNA del virus de influenza y este puede ser detectado preferencialmente en este modelo por algunos como TLR-7 y/o TLR-8 los cuales no fueron evaluados pero se encuentran río arriba de la proteína adaptadora MYD88 (111,112).

Para la resolución de la respuesta exacerbada antiviral se necesita que las alternativas terapéuticas tengan acción sobre vías de señalización de la respuesta innata. El factor de transcripción κ B (NF- κ B) es activado por diversos patógenos incluyendo el VIA, y juega un papel importante en la inducción de interferones y también cumple con algunas otras funciones durante la infección por VIA así como este es identificado a su vez por ser responsable de la hiperactivación de la respuesta antiviral e inflamatoria (113,114). La elevación de la expresión de *NFKB1* a las 24 horas del grupo infección y del grupo VIA + DEC20 con respecto al MOCK indica una mayor respuesta al estímulo viral en la búsqueda de inducir una respuesta robusta contra el agente patógeno donde a su vez el grupo tratado con DEC sin infección tiene un incremento al igual que los grupos mencionados, lo cual se presenta de manera temporal ya que a las 48 horas ninguno de estos comportamientos persisten lo cual da lugar a que la respuesta sea dada de forma rápida y no continua.

NLRP3 es otro elemento crítico implicado en diversas enfermedades ya que su participación en eventos de señalización enfatiza que su activación determina la intensidad de la inflamación (115,116). A las 48 horas la expresión de NLRP3 elevada en el grupo infección con respecto al MOCK indica que la respuesta por parte del virus activa la expresión un estado inflamatorio. Con los grupos infectados y tratados con DEC no se observó un aumento en los niveles de expresión con respecto al resto de los grupos indicando un posible mecanismo regulatorio. Hallazgos de este tipo pueden indicar también que las partículas virales tengan una mayor capacidad de evasión de la

respuesta inmune del hospedero por la inhibición de la respuesta de tormenta de citocinas por parte de la vía de NLRP3 como se ha reportado previamente (117).

Los interferones tipo I (IFN- α & IFN- β) y tipo III (IFN- λ) son citocinas antivirales producidas por el hospedero que reducen la proliferación viral en pulmón frente a las infecciones virales respiratorias, pero a su vez estos también son capaces de agravar la patología pulmonar al encontrarse secretados de forma desregulada (118,119). Nosotros reportamos un aumento en los niveles de *IFNB1* en el grupo de infección con respecto al MOCK. A las 48 horas este aumento en el grupo infección persiste haciéndose notar de forma significativa frente al resto de los grupos. La lesión epitelial se ha reportado que es mediada por citocinas, entre ellas destacan los interferones de tipo I, donde pueden contribuir a la lesión del tejido apoptótico debido a la respuesta exacerbada de la secreción de IFN- α e IFN- β puede llegar a ser perseverante e ininterrumpida (120). En nuestros resultados los grupos infectados y tratados con DEC mantuvieron los niveles de IFN- β disminuidos comparados con solo el grupo infectado, por lo que podría indicar que las células presentarían un menor daño debido al posible efecto modulador de la DEC. Por otro lado, el IFNL1 permaneció elevado en todos los grupos a las 24 y 48 horas con respecto al MOCK. Se ha demostrado que una respuesta inflamatoria exagerada da como resultado a la adición de daño tisular sustancial al daño citopático inducido por el virus. Los interferones de tipo III destacan por ser “menos inflamatorios” (121) que los de tipo I al tener una respuesta menos potente donde la respuesta antiviral protectora es llevada a cabo sin provocar inflamación dañina a través de mecanismos como la inhibición de la replicación de RNA viral tal y como es el caso con interferones de tipo I (122). No se puede descartar la presencia de mecanismos antivirales a través de interferones aun cuando en el presente modelo se aprecia respuesta deficiente de algunas señales de inflamación ya que Coates y cols. (47) demostraron en ensayos con inhibidores del inflamasoma, como la ausencia de su acción no influye sobre la secreción de IFNs de tipo I. Actualmente, los análisis bioinformáticos han llegado a elucidar que en células epiteliales a los 3 días postinfección de VIA los mecanismos inducidos son aquellos relacionados a la actividad antiviral promovida por estos interferones (20). El papel de los interferones y su relevancia se ve reflejado a través de ensayos del grupo de trabajo de Bojkova y cols. (67) donde al adicionar sobrenadantes de células

previamente infectadas con una cepa de Omicron (BA.1) en células infectadas con VIA se obtiene una respuesta dosisdependiente en la que se ve reflejado un menor porcentaje de células positivas para el VIA. El estado antiviral es entonces inducido por interferones tipo I y tipo III que se evidencia que están presentes en estos mismos sobrenadantes.

En nuestros resultados no se encontraron diferencias significativas en el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) a los tiempos 24 y 48 horas. El contexto de infección de este modelo atiende solo las respuestas de una línea celular de epitelio respiratorio y no de otras células como macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK) y subpoblaciones de linfocitos T de los cuales se ha visto un efecto distintivo al evaluar a esta citocina en otros modelos de respuesta a patógenos (31,123). El caso de IL-6 es similar ya que es otra citocina que puede ser sintetizada y secretada en respuesta a los PAMPs y en respuesta a citocinas por diversas células. En este escenario IL-6 no tiene cambios significativos entre ninguno de los grupos a las 24 y 48 horas. Otra citocina pro inflamatoria de alta relevancia es la IL-15 para la cual no se observaron diferencias significativas a excepción de la primera concentración donde la cantidad del analito determinado resultó estar en los límites de detección. Esta citocina está relacionada con la proliferación y la supervivencia de células citotóxicas por lo cual estimula la eliminación viral a través de células NK y T CD8⁺ sin embargo la relación que pudiera haber de un proceso de secreción de esta citocina pudiera estar más relacionada con la procedencia de macrófagos residentes de tejido (124) aun cuando sigue siendo relevante la producción de IL-15 por células epiteliales (125).

RANTES es necesaria para una respuesta inmune apropiada ya que contrarresta la expansión viral, favorece la supervivencia de macrófagos residentes de tejido, promueve la reprogramación de macrófagos a fenotipos proinflamatorios y cumple con un papel mediador del reclutamiento de linfocitos T y con el establecimiento de tejidos linfoides asociados a bronquios lo cual establece y contribuye también no solo de forma innata sino ya en una respuesta relacionada a la memoria inmunológica (126). Aunque anteriormente se había sugerido un efecto de la DEC sobre la producción de RANTES

(127) en nuestra investigación no encontramos diferencias significativas entre los grupos de estudio.

La citocina IL-8 es también miembro de la familia de las quimiocinas, conocida así como CXCL8 y aunque es conocida por ser secretada por macrófagos, son también las células epiteliales quienes en ciertas circunstancias brindan un aumento de la misma (128). Cuando se habla del síndrome de tormenta de citocinas frente a la infección por VIA se explica como causa de ellas un incremento desmedido de IL-8 (129), es por ello la importancia de regular esta citocina. En nuestros resultados se observó una disminución significativa en el grupo infectado y tratado con DEC a 2 μ g/mL a las 24 horas comparado con el grupo infectado sin DEC. IL-8 es el principal quimioatrayente de neutrófilos producido por las células epiteliales del pulmón después de una infección experimental debido a su rol exclusivo en condiciones de inflamación y su papel funcional en base a gradientes ideales de concentración en el sitio donde el insulto está presente (128,130–132). Por lo tanto, la regulación de la IL-8 mostrada en nuestros resultados en etapas tempranas de la infección podría favorecer a un menor daño.

La determinación del título viral es de gran utilidad cuando se busca evaluar el comportamiento de diversas variables en un escenario como el que se llevó a cabo en este modelo experimental por lo cual su aplicación e implementación fue indispensable (133). Los títulos virales de los sobrenadantes de los grupos infectados y tratados con DEC 2 μ g/mL a las 24 y 48 horas fueron significativamente menores al título viral del grupo infección. Por una parte, las infecciones virales pueden ser controladas por algunos fármacos de forma directamente proporcional y dosis dependiente, donde a una mayor dosis del compuesto administrado se observará un mayor efecto antiviral. Por la otra manera, existe el efecto de hormesis, en el cual para lograr el efecto deseado solo se debe administrar una dosis determinada y menor a la cual puede llegar a ser ya una dosis tóxica con efectos dañinos u opuestos a los deseados (134,135). No han sido reportados anteriormente los mecanismos moleculares que subyacen respecto a este mecanismo de resistencia de las células del hospedero a la infección y propagación por el virus de la influenza en un contexto de efecto hormético donde una menor dosis de dietilcarbamacina genera un mayor efecto antiviral. En contraste el grupo infectados y

tratado con DEC 100 μ g/mL, el título se vio elevado diferencialmente lo cual sustenta lo mencionado anteriormente. La dosis intermedia de DEC 20 μ g/mL muestra una tendencia hacia un menor título viral tanto a las 24 como a las 48 horas.

Es de relevancia funcional cada uno de los aspectos que involucran la respuesta de interferones ya que esto favorece el estado de protección de las células epiteliales de partículas virales. La menor expresión de IFN β en células epiteliales infectadas y tratadas con DEC con respecto al control infección ocurre a las 48 horas y a su vez DEC mantiene los niveles de IFN λ en células epiteliales. Esto indica una respuesta temprana y transitoria de tipo I y una respuesta sostenida de tipo III lo cual se asocia a una respuesta menos grave y a una mejor resolución de la enfermedad cuando se lleva a un contexto clínico (67). La disminución del título viral en sobrenadantes de cultivos de células A549 tratadas con la menor concentración de DEC indican un mayor efecto antiviral que contribuye a su vez a la modulación de la respuesta inmunológica de las células epiteliales contra el VIA.

CAPITULO 10

CONCLUSIÓN

La DEC mantiene la expresión de IFN- λ 1, regula los niveles de IFN- β e IL-8 y reduce la carga viral en células epiteliales infectadas por el Virus de Influenza A H1N1 pandémico del 2009.

CAPITULO 11

PERSPECTIVAS

- Analizar los niveles de las proteínas de interferones tipo I y tipo III.
- Evaluar la secreción de TFG- β .
- Llevar a cabo análisis de rutas de señalización.
- Evaluar el efecto sobre:
 - Distintas líneas celulares.
 - Multiplicidad de infección (MOI).
 - Infecciones con otros agentes virales.
 - Distintos periodos post-infección y post-tratamiento.
 - Otros fármacos.
- Ensayos sobre modelos animales y pre-clínicos.

REFERENCIAS

1. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):74-98.
2. Abdoli A, Jamali A. Determining Influenza Virus Shedding at Different Time. *CELL J.* 2013;15(2).
3. Khaled Mostafa. Influenza (Seasonal). World Health Organization [Internet]. 2023; Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
4. Nuwarda RF, Alharbi AA, Kayser V. An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines.* 2021;9(9):1032.
5. Córdova-Villalobos JÁ. La epidemia de influenza A/H1N1 en México. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2010.
6. SINAVE/DGE/SSA/Vigilancia epidemiológica de Enfermedad Respiratoria Viral, acceso a plataforma el 14 de marzo 2024.
7. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(1):47-60.
8. Dhawan S, Biswas P. Aerosol Dynamics Model for Estimating the Risk from Short-Range Airborne Transmission and Inhalation of Expiratory Droplets of SARS-CoV-2. *Environ Sci Technol.* 2021;55(13):8987-99.
9. Macias AE, McElhaney JE, Chaves SS, Nealon J, Nunes MC, Samson SI, et al. The disease burden of influenza beyond respiratory illness. *Vaccine.* 2021;39:A6-14.
10. Sánchez-de Prada L, Ortiz De Lejarazu-Leonardo R, Castrodeza-Sanz J, Tamayo-Gómez E, Eiros-Bouza JM, Sanz-Muñoz I. Do Vaccines Need a Gender Perspective? Influenza Says Yes! *Front Immunol.* 2021;12:715688.
11. Huang Y, Zhu W, Zeng X, Li S, Li X, Lu C. Innate and adaptive immune responses in patients with pandemic influenza A(H1N1)pdm09. *Arch Virol.* 2013;158(11):2267-72.
12. Choreño-Parra JA, Jiménez-Álvarez LA, Cruz-Lagunas A, Rodríguez-Reyna TS, Ramírez-Martínez G, Sandoval-Vega M, et al. Clinical and Immunological Factors That Distinguish COVID-19 From Pandemic Influenza A(H1N1). *Front Immunol.* 2021;12:593595.
13. Global Respiratory Virus Activity Weekly Update N° 476. 2024. Summary was

generated by the WHO Global Influenza Programme based on data available in RespiMart on 22/05/2024 12:15:39 PM UTC.

14. Hewitt RJ, Lloyd CM. Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(6):347-62.
15. Rivas-Santiago BT, Torres-Rojas M, Bobadilla-Lozoya K, Sada-Díaz E. Papel de las células epiteliales en la respuesta inmune del pulmón. 2005;18.
16. Whitsett JA. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(Supplement_3):S143-8.
17. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature.* 2018;560(7718):377-81.
18. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J.* 2015;45(4):1150-62.
19. Hiemstra PS, Tetley TD, Janes SM. Airway and alveolar epithelial cells in culture. *Eur Respir J.* 2019;54(5):1900742.
20. Greaney AM, Raredon MSB, Kochugaeva MP, Niklason LE, Levchenko A. SARS-CoV-2 leverages airway epithelial protective mechanism for viral infection. *iScience.* 2023;26(3):106175.
21. Justice JL, Cristea IM. Nuclear antiviral innate responses at the intersection of DNA sensing and DNA repair. *Trends Microbiol.* 2022;30(11):1056-71.
22. Majdoul S, Compton AA. Lessons in self-defence: inhibition of virus entry by intrinsic immunity. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(6):339-52.
23. Casanova JL, Abel L. Mechanisms of viral inflammation and disease in humans. *Science.* 2021;374(6571):1080-6.
24. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respir Viruses.* 2008;2(5):147-54.
25. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular.* Novena Edición. España: Elsevier; 2022. 600 p.
26. Salinas-Carmona MC. *La Inmunología en la Salud y la Enfermedad.* 3a ed. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana; 2023.
27. Mejia Torres MG, Castro Corona MA, Arce Mendoza AY, Salinas Carmona MC.

Respuesta Inmune contra infecciones virales. En: La inmunología en la salud y la enfermedad. 3a ed. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana; 2023.

28. Osuna-Espinoza KY, Rosas-Taraco AG. Metabolism of NK cells during viral infections. *Front Immunol.* 2023;14:1064101.

29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Capítulo 16: Inmunidad frente a los microbios. En: *Inmunología Celular y Molecular.* 10.^a ed. España: Elsevier; 2022.

30. Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol.* 2020;38(8):970-9.

31. Farzin H, Toroghi R, Haghparast A. Up-Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokine Production in Avian Influenza H9N2 Virus-Infected Human Lung Epithelial Cell Line (A549). *Immunol Invest.* 2016;45(2):116-29.

32. Auladell M, Jia X, Hensen L, Chua B, Fox A, Nguyen THO, et al. Recalling the Future: Immunological Memory Toward Unpredictable Influenza Viruses. *Front Immunol.* 2019;10:1400.

33. Mahapatro M, Erkert L, Becker C. Cytokine-Mediated Crosstalk between Immune Cells and Epithelial Cells in the Gut. *Cells.* 2021;10(1):111.

34. Yuan S, Jiang SC, Zhang ZW, Fu YF, Hu J, Li ZL. Quantification of Cytokine Storms During Virus Infections. *Front Immunol.* 2021;12:659419.

35. Meseko C, Sanicas M, Asha K, Sulaiman L, Kumar B. Antiviral options and therapeutics against influenza: history, latest developments and future prospects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1269344.

36. Tejada S, Tejo AM, Peña-López Y, Forero CG, Corbella X, Rello J. Neuraminidase inhibitors and single dose baloxavir are effective and safe in uncomplicated influenza: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2021;14(7):901-18.

37. Holmes EC, Hurt AC, Dobbie Z, Clinch B, Oxford JS, Piedra PA. Understanding the Impact of Resistance to Influenza Antivirals. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(2):e00224-20.

38. Kumari R, Sharma SD, Kumar A, Ende Z, Mishina M, Wang Y, et al. Antiviral Approaches against Influenza Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2023;36(1):e00040-22.

39. Nachbagauer R, Palese P. Is a Universal Influenza Virus Vaccine Possible? *Annu Rev Med.* 2020;71(1):315-27.
40. Tchounwou P. Environmental Research and Public Health. *Int J Environ Res Public Health.* 2004;1(1):1-2.
41. Wong KH, Lal SK. Alternative antiviral approaches to combat influenza A virus. *Virus Genes.* 2023;59(1):25-35.
42. Yamazaki T, Masumoto J, Agematsu K, Sawai N, Kobayashi S, Shigemura T, et al. Anakinra improves sensory deafness in a Japanese patient with Muckle-Wells syndrome, possibly by inhibiting the cryopyrin inflammasome. *Arthritis Rheum.* 2008;58(3):864-8.
43. Kommission Pharmakotherapie der DGRh, Manger B, Gaubitz M, Michels H. Empfehlungen zur Therapie mit Interleukin-1 β -blockierenden Wirkstoffen. *Z Für Rheumatol.* 2009;68(9):766-71.
44. Morris G, Bortolasci CC, Puri BK, Marx W, O'Neil A, Athan E, et al. The cytokine storms of COVID-19, H1N1 influenza, CRS and MAS compared. Can one sized treatment fit all? *Cytokine.* 2021;144:155593.
45. Tamura K, Ishikawa G, Yoshie M, Ohneda W, Nakai A, Takeshita T, et al. Glibenclamide inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion in human trophoblasts. *J Pharmacol Sci.* 2017;135(2):89-95.
46. Zhang G, Lin X, Zhang S, Xiu H, Pan C, Cui W. A Protective Role of Glibenclamide in Inflammation-Associated Injury. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1-11.
47. Coates BM, Staricha KL, Ravindran N, Koch CM, Cheng Y, Davis JM, et al. Inhibition of the NOD-Like Receptor Protein 3 Inflammasome Is Protective in Juvenile Influenza A Virus Infection. *Front Immunol.* 2017;8:782.
48. Peng S, Gao J, Liu W, Jiang C, Yang X, Sun Y, et al. Andrographolide ameliorates OVA-induced lung injury in mice by suppressing ROS-mediated NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation. *Oncotarget.* 2016;7(49):80262-74.
49. Chakravarti RN, Chakravarti D. Andrographolide, the Active Constituent of *Andrographis Paniculata* Nees. A Preliminary Communication. *The Indian Medical Gazette.* 1951; 96.
50. Islam MT, Bardaweel SK, Mubarak MS, Koch W, Gawel-Beben K, Antosiewicz B, et al. Immunomodulatory Effects of Diterpenes and Their Derivatives Through NLRP3

Inflammasome Pathway: A Review. *Front Immunol.* 2020;11:572136.

51. Zhao W, Ma L, Cai C, Gong X. Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- κ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. *Int J Biol Sci.* 2019;15(8):1571-81.

52. Mencarelli A, Bist P, Choi HW, Khameneh HJ, Mortellaro A, Abraham SN. Anaphylactic degranulation by mast cells requires the mobilization of inflammasome components. *Nat Immunol.* 2024;25(4):693-702.

53. Clazure M, Valdivieso ÁG, Dugour AV, Mori C, Massip-Copiz MM, Aguilar MÁ, et al. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) and caspase 1 (CASP1) modulation by intracellular Cl⁻ concentration. *Immunology.* 2021;163(4):493-511.

54. Audia JP, Yang XM, Crockett ES, Housley N, Haq EU, O'Donnell K, et al. Caspase-1 inhibition by VX-765 administered at reperfusion in P2Y₁₂ receptor antagonist-treated rats provides long-term reduction in myocardial infarct size and preservation of ventricular function. *Basic Res Cardiol.* 2018;113(5):32.

55. Sun Z, Nyanzu M, Yang S, Zhu X, Wang K, Ru J, et al. VX765 Attenuates Pyroptosis and HMGB1/TLR4/NF- κ B Pathways to Improve Functional Outcomes in TBI Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2020:1-21.

56. Keller M, Sollberger G, Beer HD. Thalidomide Inhibits Activation of Caspase-1. *J Immunol.* 2009;183(9):5593-9.

57. Montero MT, Matilla J, Gómez-Mampaso E, Lasunción MA. Geranylgeraniol Regulates Negatively Caspase-1 Autoprocessing: Implication in the Th1 Response against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2004;173(8):4936-44.

58. Hawking F, World Health Organization. Diethylcarbamazine a review of the literature with special reference to its pharmacodynamics, toxicity, and use in the therapy of onchocerciasis and other filarial infections. *WHO/ONCHO.* 1978;(78.142):1-82.

59. Hawking F, Sewell P, Thurston JP. Mode of action of hetrazan in filariasis. *The Lancet.* 1948; 730.

60. Molyneux D. The Theory of Everything and a neglected tropical disease: a Hawking legacy. *The Lancet.* 2015;385(9973):1069-70.

61. Hawking F, Marques RJ. Control of Bancroftian Filariasis by Cooking Salt Medicated with Diethylcarbamazine. *Bull Wld Hlth Org.* 1967, 37, 405-414.

62. Mazzotti L. Posibilidad de utilizar como medio diagnostico en la oncocercosis las reacciones alergicas consecutivas a la administracion de 'Hetrazan'. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mexico)*. 1948;9:233.
63. DrugBank. Diethylcarbamazine [Internet]. 2005. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00711#>
64. National Center for Biotechnology Information. PubChem Bioassay Record for Bioactivity AID 1671498 - SID 103191069 [Internet]. Source: ChEMBL; 2023. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1671498#sid=103191069>.
65. Cann A. Principios de virología molecular. Zaragoza, España: Acribia; 2009.
66. Carballal G. Virología médica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Corpus; 2015.
67. Bojkova D, Bechtel M, Rothenburger T, Kandler JD, Hayes L, Olmer R, et al. Omicron-induced interferon signaling prevents influenza A H1N1 and H5N1 virus infection. *J Med Virol*. 2023;95(3):e28686.
68. Barilli A, Visigalli R, Ferrari F, Bianchi MG, Dall'Asta V, Rotoli BM. Immune-Mediated Inflammatory Responses of Alveolar Epithelial Cells: Implications for COVID-19 Lung Pathology. *Biomedicines*. 2022;10(3):618.
69. Abdul-Sater AA, Koo E, Häcker G, Ojcius DM. Inflammasome-dependent Caspase-1 Activation in Cervical Epithelial Cells Stimulates Growth of the Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26789-96.
70. Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1323(1):115-39.
71. Francis M, King M, Kelvin A. Back to the Future for Influenza Preimmunity—Looking Back at Influenza Virus History to Infer the Outcome of Future Infections. *Viruses*. 2019;11(2):122.
72. Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala V, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol*. 2021;93(8):4638-46.
73. A.A. M, Soler S, Wegner J, Bartok, E, Stankovic S, Brooks AG, et al. Influenza A Infection Stimulates RIG-I and Enhances Effector Function of Primary Human NK Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12220):16.
74. Wu W, Zhang W, Duggan ES, Booth JL, Zou MH, Metcalf JP. RIG-I and TLR3 are

both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells. *Virology*. 2015;482:181-8.

75. Jureka AS, Kleinpeter AB, Tipper JL, Harrod KS, Petit CM. The influenza NS1 protein modulates RIG-I activation via a strain-specific direct interaction with the second CARD of RIG-I. *J Biol Chem*. 2020;295(4):1153-64.

76. Benitez AA, Panis M, Xue J, Varble A, Shim JV, Frick AL, et al. In Vivo RNAi Screening Identifies MDA5 as a Significant Contributor to the Cellular Defense against Influenza A Virus. *Cell Rep*. 2015;11(11):1714-26.

77. Lozhkov AA, Plotnikova MA, Egorova MA, Baranovskaya IL, Elpaeva EA, Klotchenko SA, et al. Simultaneous Detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 Expression Is a Convenient Tool for Evaluation of the Interferon-Mediated Response. *Viruses*. 2022;14(10):2090.

78. Edwards MR, Strong K, Cameron A, Walton RP, Jackson DJ, Johnston SL. Viral infections in allergy and immunology: How allergic inflammation influences viral infections and illness. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):909-20.

79. Abulafia DP, De Rivero Vaccari JP, Lozano JD, Lotocki G, Keane RW, Dietrich WD. Inhibition of the Inflammasome Complex Reduces the Inflammatory Response after Thromboembolic Stroke in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(3):534-44.

80. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. *Immunity*. 2009;30(4):556-65.

81. Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(9):2114-27.

82. Harris J, Borg NA. The multifaceted roles of NLRP3-modulating proteins in virus infection. *Front Immunol*. 2022;13:987453.

83. Liu Q, Zhou Y hong, Yang Z qiu. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(1):3-10.

84. Ryabkova VA, Churilov LP, Shoenfeld Y. Influenza infection, SARS, MERS and COVID-19: Cytokine storm – The common denominator and the lessons to be learned. *Clin Immunol*. 2021;223:108652.

85. Roan F, Obata-Ninomiya K, Ziegler SF. Epithelial cell–derived cytokines: more than

just signaling the alarm. *J Clin Invest*. 2019;129(4):1441-51.

86. Flores-Torres AS, Rendon A, Salinas-Carmona MC, Salinas E, Rosas-Taraco AG. Human Eosinophils Reduce Viral Titer, Secrete IL-8, and Increase RIG-I Expression in Response to Influenza A H1N1 pdm09. *Viral Immunol*. 2021;34(8):573-8.

87. Ramírez-Martínez G, Cruz-Lagunas A, Jiménez-Alvarez L, Espinosa E, Ortíz-Quintero B, Santos-Mendoza T, et al. Seasonal and pandemic influenza H1N1 viruses induce differential expression of SOCS-1 and RIG-I genes and cytokine/chemokine production in macrophages. *Cytokine*. 2013;62(1):151-9.

88. Medina-De La Garza CE, Brattig NW, Tischendorf FW and Jarret JMB. Serum-dependent interaction of granulocytes with *Onchocerca vo/vu/us* microfilariae in generalized and chronic hyper-reactive onchocerciasis and its modulation by diethylcarbamazine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1990. 84: p, (6).

89. Mohana Karthikeyan S, Nikisha GN. Efficacy and Safety of Diethylcarbamazine in Treatment of Allergic Rhinitis: A Double Blind Randomised Controlled Trial. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;74(S2):1169-77.

90. Segoviano-Ramirez JC, Garcia-Ramirez A, De La Rosa-Tamez S, Garcia-Juarez J, Castro-Corona MA, Medina-De La Garza CE. Analysis of the immunomodulatory effect of diethylcarbamazine (DEC) on new mechanisms of anti-infectious response in human polymorphonuclear cells. *Histology and Histopathology*. 2017;32, n.º Supplement 1.

91. Jia G, Zao M, Liu X. Protective effect of diethylcarbamazine inhibits NF- κ B activation in isoproterenol-induced acute myocardial infarction rat model through the PARP pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):1596-602.

92. Peixoto CA, Silva BS. Anti-inflammatory effects of diethylcarbamazine: A review. *Eur J Pharmacol*. 2014;734:35-41.

93. García-Hernández M, Castro-Corona MA, Segoviano-Ramírez JC, Brattig NW, Medina-De La Garza CE. Immunomodulatory effect of diethylcarbamazine in mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):113-20.

94. Medina-De La Garza CE, Guerrero-Ramírez G, García-Hernández M, Castro-Corona MA, Torres-López E, Brattig NW, et al. Immunomodulatory activity of diethylcarbamazine on humoral, cellular cytokine response and respiratory burst in

BALB/c mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012;34(3):477-83.

95. Rodrigues GB, Oliveira EE, Junior FJBM, Santos LAMD, Oliveira WHD, França MERD, et al. A new diethylcarbamazine formulation (NANO-DEC) as a therapeutic tool for hepatic fibrosis. *Int Immunopharmacol*. 2018;64:280-8.

96. Santos LAM, Ribeiro EL, Barbosa KPS, Fragoso IT, Gomes FODS, Donato MAM, et al. Diethylcarbamazine inhibits NF- κ B activation in acute lung injury induced by carrageenan in mice. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):153-62.

97. Pinsky MR, Roman A, Buurman W, Content J, Vincent JL. Effect of Ibuprofen and Diethylcarbamazine on the Hemodynamic and Inflammatory Response to Endotoxin in the Dog. *Eur Surg Res*. 2000;32(2):74-86.

98. Medina-De La Garza CE, Salvador Flores-Torres A, García-Hernández M, De Los Ángeles Castro-Corona M. Diethylcarbamazine as potential treatment of COVID-19 lung fibrosis. *Med Hypotheses*. 2022;160:110774.

99. Abeygunasekera A, Jayasinghe S. Is the anti-filarial drug diethylcarbamazine useful to treat COVID-19? *Med Hypotheses*. 2020;143:109843.

100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

101. Thoresen D, Wang W, Galls D, Guo R, Xu L, Pyle AM. The molecular mechanism of RIG-I activation and signaling. *Immunol Rev*. 2021;304(1):154-68.

102. Dobashi M, Shiratori T, Imaizumi T, Hashimoto S, Kawaguchi S, Seya K, et al. Toll-like receptor 3 signaling induces interferon-induced transmembrane protein 1 in BEAS-2B cells. *Exp Biol Med*. 2022;247(21):1917-22.

103. Johnson AN, Dickinson J, Nelson A, Gaurav R, Kudrna K, Evans SE, et al. Effect of epithelial-specific MyD88 signaling pathway on airway inflammatory response to organic dust exposure. *J Immunotoxicol*. 2023;20(1):2148782.

104. Seo SU, Kwon HJ, Song JH, Byun YH, Seong BL, Kawai T, et al. MyD88 Signaling Is Indispensable for Primary Influenza A Virus Infection but Dispensable for Secondary Infection. *J Virol*. 2010;84(24):12713-22.

105. Shi R, Wang Q, Ouyang Y, Wang Q, Xiong X. Picfeltaenin IA inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production by the nuclear factor- κ B pathway in human pulmonary epithelial A549 cells. *Oncol Lett*. 2016;11(2):1195-200.

106. Ji S, Dai MY, Huang Y, Ren XC, Jiang ML, Qiao JP, et al. Influenza A virus triggers acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by increasing proinflammatory cytokines secretion via NLRP3 inflammasome activation. *J Inflamm.* 2022;19(1):8.
107. Pandey KP, Zhou Y. Influenza A Virus Infection Activates NLRP3 Inflammasome through Trans-Golgi Network Dispersion. *Viruses.* 2022;14(1):88.
108. Jiang M, Zhang S, Yang Z, Lin H, Zhu J, Liu L, et al. Self-Recognition of an Inducible Host lncRNA by RIG-I Feedback Restricts Innate Immune Response. *Cell.* 2018;173(4):906-919.e13.
109. Rahman S, Ansari M, Gaur P, Ahmad I, Chakravarty C, Verma D, et al. The Immunomodulatory CEA Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6/CD66c) Is a Protein Receptor for the Influenza A Virus. *Viruses.* 2021;13(5):726.
110. Rumpret M, Von Richthofen HJ, Peperzak V, Meyaard L. Inhibitory pattern recognition receptors. *J Exp Med.* 2022;219(1):e20211463.
111. Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):566-80.
112. Li X, Gu M, Zheng Q, Gao R, Liu X. Packaging signal of influenza A virus. *Virol J.* 2021;18(1):36.
113. Ludwig S, Hrinčius ER, Boergeling Y. The Two Sides of the Same Coin—Influenza Virus and Intracellular Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021;11(1):a038513.
114. Sallenave JM, Guillot L. Innate Immune Signaling and Proteolytic Pathways in the Resolution or Exacerbation of SARS-CoV-2 in Covid-19: Key Therapeutic Targets? *Front Immunol.* 2020;11:1229.
115. Qin Y, Meng X, Wang M, Liang W, Xu R, Chen J, et al. Posttranslational ISGylation of NLRP3 by HERC enzymes facilitates inflammasome activation in models of inflammation. *J Clin Invest.* 2023;133(20):e161935.
116. Niu J, Cui M, Yang X, Li J, Yao Y, Guo Q, et al. Microbiota-derived acetate enhances host antiviral response via NLRP3. *Nat Commun.* 2023;14(1):642.
117. Zheng Q, Hua C, Liang Q, Cheng H. The NLRP3 inflammasome in viral infection (Review). *Mol Med Rep.* 2023;28(3):160.

118. Lin JY, Huang HI. Respiratory viruses induce the expression of type I and III IFNs in MSCs through RLR/IRF3 signaling pathways. *Microbes Infect.* 2023;25(7):105171.
119. Major J, Crotta S, Llorian M, McCabe TM, Gad HH, Priestnall SL, et al. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. 2020;
120. Högner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber AD, Kalinke U, et al. Macrophage-expressed IFN- β Contributes to Apoptotic Alveolar Epithelial Cell Injury in Severe Influenza Virus Pneumonia. Basler CF, editor. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003188.
121. Casazza RL, Lazear HM. Why Is IFN- λ Less Inflammatory? One IRF Decides. *Immunity.* 2019;51(3):415-7.
122. Plotnikova M, Lozhkov A, Romanovskaya-Romanko E, Baranovskaya I, Sergeeva M, Kaa K, et al. IFN- λ 1 Displays Various Levels of Antiviral Activity In Vitro in a Select Panel of RNA Viruses. *Viruses.* 2021;13(8):1602.
123. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M. Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-stranded RNA and Influenza A Virus. *J Biol Chem.* 2005; 280 (7):5571-80.
124. Zhang W, Zhang Q, Yang N, Shi Q, Su H, Lin T, et al. Crosstalk between IL-15R α + tumor-associated macrophages and breast cancer cells reduces CD8 + T cell recruitment. *Cancer Commun.* 2022;42(6):536-57.
125. Karlen H, Yousefi S, Simon HU, Simon D. IL-15 Expression Pattern in Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(6):417-21.
126. Ferrero MR, Tavares LP, Garcia CC. The Dual Role of CCR5 in the Course of Influenza Infection: Exploring Treatment Opportunities. *Front Immunol.* 2022;12:826621.
127. Medina-De La Garza C, Salinas-Carmona M, Brattig N. In vitro RANTES production stimulated by Diethylcarbamazine and Ivermectin. 2000;14:A1091.
128. Schlievert PM, Kilgore SH, Benavides A, Klingelutz AJ. Pathogen Stimulation of Interleukin-8 from Human Vaginal Epithelial Cells through CD40. LaRock CN, editor. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2):e00106-22.
129. Rendón-Ramírez EJ, Ortiz-Stern A, Martínez-Mejía C, Salinas-Carmona MC, Rendon A, Mata-Tijerina VL, et al. TGF- β Blood Levels Distinguish Between Influenza A (H1N1)pdm09 Virus Sepsis and Sepsis due to Other Forms of Community-Acquired Pneumonia. *Viral Immunol.* 2015;28(5):248-54.

130. Doran KS, Chang JCW, Benoit VM, Eckmann L, Nizet V. Group B Streptococcal β -Hemolysin/Cytolysin Promotes Invasion of Human Lung Epithelial Cells and the Release of Interleukin-8. *J Infect Dis.* 2002 Jan 15;185(2):196-203.
131. Cambier S, Gouwy M, Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell Mol Immunol.* 2023;20(3):217-51.
132. Hou Y, Huttenlocher A. Advancing chemokine research: the molecular function of CXCL8. *J Clin Invest.* 2024;134(10):e180984.
133. Use of Crystal Violet to Improve Visual Cytopathic Effect-based Reading for Viral Titration using TCID₅₀ Assays. [Internet]. *J. Vis. Exp.* (180), e63063, JOVE; 2022. Disponible en: doi:10.3791/63063
134. Bauer M, Ermolaeva M, Singer M, Wetzker R, Soares MP. Hormesis as an adaptive response to infection. *Trends Mol Med.* 2024;S147149142400100X.
135. Panfoli I, Puddu A, Bertola N, Ravera S, Maggi D. The Hormetic Effect of Metformin: “Less Is More”? *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6297.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Luis Carlos Ruelas Ruiz

Candidato para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Título de tesis: Análisis de la acción de la dietilcarbamacina sobre efectores de la respuesta antiviral en células epiteliales infectadas con el virus de la influenza A H1N1 pdm09.

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Ciudad Obregón, Sonora, México el 25 de abril de 1997, hijo de Ismael Arturo Ruelas Rodríguez y Anita Ruiz Montaña.

Educación: Egresado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora con el grado de Licenciatura en Químico Biólogo Clínico en el año 2021.

Realizó una estancia de movilidad estudiantil en la facultad de ciencias de la salud de la Universidad de Boyacá bajo el programa de pregrado de Bacteriología y laboratorio clínico en Tunja, Boyacá, Colombia.