

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL LICENCIATURA**  
**EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Informe final de Servicio Social

**“Participación de las proteínas transmembranales 1 y 3 (IFITM-1 e IFITM-3)  
en la infección por el virus de influenza en un modelo murino.”**

Prestador de Servicio Social:

**Paloma Campero Manríquez**

Matrícula: 2163064535

Asesor Interno:

  
**Dr. José Antonio Martínez García**

No. económico: 26263

Asesor Externo:



**Dr. Gustavo Ramírez Martínez**

Cédula Profesional Doctorado: 7562719

Lugar de realización:

Laboratorio de Inmunología y Genética, Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Fecha de inicio y terminación:

01 septiembre del 2022 al 01 de marzo de 2023

**Contenido**

Introducción .....	4
Objetivo General.....	6
Material y Métodos .....	7
Actividades realizadas.....	9
Objetivos y metas alcanzadas .....	9
Resultados.....	10
Discusión .....	17
Conclusiones .....	19
Bibliografía.....	19

## **Resumen**

La influenza tipo A es un grave problema de salud mundial causado por un virus ARN de la familia *Orthomyxoviridae*, que produce enfermedad respiratoria con aumento de células inflamatorias y daño pulmonar. Esta patología tiene una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo y puede presentar un comportamiento pandémico. El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Inmunobiología y Genética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER) y tuvo como objetivo establecer un modelo animal y evaluar la expresión de IFITM frente a la infección con A/H1N1 en un modelo animal conformado por ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, dividido en 2 grupos: controles (n=4) e infectados (n=9). Por inmunohistoquímica se caracterizó el daño tisular y se confirmó la infección viral en el tejido pulmonar, evaluando la pérdida secuencial de peso de los ratones, el daño pulmonar y la expresión de proteínas para determinar la gravedad de la infección. Estos parámetros se correlacionaron con los niveles de expresión en tejido de moléculas inducibles a interferón (IFITMs) En conclusión, el modelo animal por instilación intranasal establecido en este proyecto demuestra que es reproducible y eficiente para el estudio de infección de influenza y poder estudiar así la patogénesis producida por el virus así como la interacción virus-hospedero.

Palabras clave: influenza, interferón, modelo animal, instilación, infección.

## **Introducción**

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son la causa principal de morbilidad y mortalidad por enfermedad infecciosa en todo el mundo y afectan en especial a los menores y ancianos (OMS, 2014). Estas infecciones como es la influenza tipo A, representan un problema de salud pública debido a epidemias anuales identificadas y los riesgos de una pandemia como la última registrada en 2009 con el virus de influenza tipo A/H1N1.

La influenza es una infección respiratoria aguda de origen viral, puede afectar la mucosa nasal, la faríngea, bronquios así como alvéolos pulmonares. Esta patología es de una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo y puede tener un comportamiento pandémico. El virus de influenza infecta las vías respiratorias inferiores y superiores, causando enfermedades respiratorias severas (Tscherne & García-Sastre, 2011).

La influenza es causada por los virus de la influenza A, B y C. Los brotes pandémicos recientes como el de 2009 han involucrado a la cepa del virus de influenza A de origen zoonótico. La gravedad de la infección depende, entre otros factores, de la virulencia de la cepa viral así como el nivel de inmunidad preexistente. En humanos, se han identificado varios factores de riesgo subyacentes para la infección, entre los que es importante mencionar la obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedad pulmonar crónica (incluido el asma), la vejez, así como un estado inmunológico comprometido. La OMS estima que las epidemias anuales de influenza provocan cerca de 1 billón de infecciones, de 3 a 5 millones de casos de enfermedades graves y de 300 mil a 500 mil muertes (Peteranderl *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 2010).

El virus de Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Son virus de ARN de cadena en sentido negativo y cuyo genoma se encuentra compuesto por siete a ocho segmentos genéticos. Estos virus son pleomórficos, principalmente esféricos con un diámetro aproximado de 80 a 120 nanómetros. En la superficie viral se distinguen dos tipos de proteínas, la Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA),

las cuales son importantes debido a que participan en la adhesión celular y en la liberación de nuevas partículas virales. Esto es sumamente importante pues constituyen blancos terapéuticos potenciales para la inhibición de la infección viral y para el restablecimiento de la respuesta inmunológica (Talledo & Zumaeta, 2009).

La infección en su etapa inicial produce que la respuesta inmune innata se active y conforme la infección progresa, se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa o específica. Estos cambios inducen un aumento en la producción de moléculas inflamatorias así como de remodelación pulmonar, que en su producción descontrolada contribuyen al daño tisular, provocando un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), que si no es resuelto por la respuesta inmune del organismo infectado, puede desencadenar en una falla multiorgánica, e incluso la muerte (WHO, 2010)

La infección se inicia cuando el virus infecta las células epiteliales y las células del sistema inmune innato como son los macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés de *Natural Killer*), y neutrófilos, presentes en el tracto respiratorio, lo que induce la secreción de Interferones tipo I (IFN  $\alpha$  y  $\beta$ ), citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos. Los IFN  $\alpha$  y  $\beta$  producidos, activan en las células vecinas la expresión de los denominados genes estimulados por Interferón, responsables de los efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomodulatorios del IFNs. Se ha descrito que el virus de influenza A/H1N1 pandémico tiene características altamente patogénicas, tales como una mayor capacidad de replicación en tejido pulmonar y una fuerte capacidad de inducir una respuesta inflamatoria así como producir una supresión de la respuesta del interferón (IFN) tipo 1 en células del sistema inmune, lo que reduce la activación de los mecanismos antivirales que son estimulados por IFN<sup>6-9</sup> Teijaro *et al.*, 2014; Iwasaki & Pillai, 2014; Hermesh *et al.*, 2010; Pulendran & Maddur, 2015 ;Regino-Zamarripa *et al.*, 2022). Existen proteínas que han sido identificadas en las células del hospedero que limitan la entrada del virus a células a nivel endosomal, llamadas proteínas transmembranales inducidas por interferón

(IFITMs) (Brass *et al.*, 2009). El estudio de estos mecanismos de defensa antiviral en las células puede contribuir a desarrollar estrategias para mejorar el manejo de la enfermedad. La importancia de las proteínas IFITM en la defensa viral también dependen de la dinámica de entrada viral y las etapas de la enfermedad en la que se evalúan estos mecanismos. Se ha descrito por ejemplo, en experimentos con 2 cepas diferentes del virus de la influenza, que las proteínas IFITM son fundamentales en la protección contra estos patógenos durante las primeras etapas de la infección, pero su papel para restringir las últimas etapas de la replicación del virus no parece ser relevantes (Meischel *et al.*, 2021). También se ha reportado que IFITM-1 e IFITM-3 tienen un patrón de expresión tejido-específico diferente frente a la infección por la cepa del virus de influenza H9N2 en ratones BALB/c (Yu *et al.*, 2015).

Es fundamental utilizar animales de laboratorio de alta calidad microbiológica y genética para obtener resultados confiables y reproducibles. Se debe garantizar el bienestar de los animales mediante un manejo adecuado, que incluya alojamiento y cuidados que les permitan desarrollarse y comportarse de manera normal, en condiciones de comodidad física y buena salud. Además, es esencial controlar el entorno experimental para minimizar las variables que puedan afectar los resultados. Todos los protocolos que involucran animales vivos deben cumplir con estrictas normas bioéticas y ser aprobados por los Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Asimismo, se deben aplicar prácticas de bioseguridad animal para manipular y eliminar adecuadamente los animales expuestos a elementos biopeligrosos. Es crucial que el personal encargado de manipular a los animales esté debidamente capacitado en los procedimientos.

### **Objetivo General**

Determinar las diferencias en cuanto expresión de IFITM-1 e IFITM-3 frente a la infección de ratones C57BL/6 infectados con el virus de influenza pandémico A/H1N1pdm09.

## **Objetivos Particulares**

- Establecer un modelo experimental de infección murino inducida por el virus de influenza A/H1N1pdm09.
- Caracterizar el daño pulmonar frente a la infección.
- Cuantificar la expresión de IFITM-1 e IFITM-3 en células de lavado bronquioalveolar (BAL) y tejido pulmonar total.

## **Material y Métodos**

### **Localización o sitio de estudio**

El protocolo se desarrolló en laboratorio de Inmunobiología y Genética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) de la CDMX.

### **Población de estudio**

Se utilizaron ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6, de entre 6 a 8 semanas. Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos, en condiciones normales de alimento, agua *ad libitum* en el Bioterio del INER. Los ratones fueron manejados de acuerdo con los lineamientos del Comité Institucional Científico y de Bioética para el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

### **Obtención de las cepas virales de influenza A/H1N1pdm09**

Se utilizaron las cepas del virus de influenza A/H1N1pdm09, los cuales se obtuvieron a partir de pacientes con neumonía grave hospitalizados en el INER durante los diferentes brotes en la Ciudad de México. Los virus fueron propagados y titulados en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Cells). La infectividad se evaluó por titulación de la dosis de infección de cultivo de tejido al 50% (DICT<sub>50</sub>) en las células MDCK.

### **Infección *in vivo* con la cepa del virus de influenza pandémico A/H1N1pdm09**

Se seleccionaron 2 grupos de ratones: 1) controles sin infección (n=4), 2) ratones infectados con la cepa A/H1N1 pandémica (n=9). Cada uno de estos ratones

fueron instilados por vía intranasal con 50 uL de solución salina para el grupo control y para el grupo infectado con  $10^6$  Unidades hemaglutinantes (UHE) de virus A/H1N1, re-suspendidas de igual forma en 50 uL de solución salina. Para la instilación, cada uno de los ratones fue anestesiado con isoflurano. Se realizó el monitoreo diario de peso y temperatura durante un periodo de 7 a 14 días. La eutanasia de los ratones se realizó cuando la pérdida del peso corporal fue del 30% del peso corporal inicial.

### **Obtención de lavado bronquioalveolar (BAL) y células a partir de tejido pulmonar total.**

Para la obtención del BAL se instilaron, inmediatamente posterior a la eutanasia de los ratones, entre 1-2 mL de solución salina y se extrajo el volumen para la separación, por centrifugación, del sobrenadante y las células. Posteriormente, se realizó la extracción de los pulmones, y se utilizó, un pulmón para evaluar por histología el daño pulmonar y el pulmón restante para la obtención de células para la extracción de mRNA.

### **Inmunohistoquímica**

Los pulmones extraídos del ratón fueron perfundidos con formol amortiguado neutro al 10%, para después ser embebidos en parafina. Se procesaron secciones pulmonares de cinco micrómetros para inmunohistoquímica (IHQ). Siguiendo los siguientes pasos: desparafinación, rehidratación y desperoxidación con 3% de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en metanol durante 30 min. Para la recuperación del antígeno se utilizó un buffer de citrato de Sodio a 0.1 mM y pH de 6.0 en microondas durante cinco minutos. Se incubó con un bloqueador universal de proteínas (1:10, Biogenex) por 10 minutos, seguido por un segundo bloqueo con suero de borrego (1:100, GIBCO) por 30 minutos, ambos a temperatura ambiente. Las láminas se incubaron toda la noche a 4°C con diluciones óptimas de los siguientes anticuerpos: anti-ratón IFITM1 (1:200; Biovision) y anti-ratón IFITM3 (1:200; Biovision), anti-ratón M1 (1:100; Abcam), anti-ratón M2 (1:150, Abcam) y seguido con un sistema multi-link (Concentrated MultiLink biotinylated anti-Ig,



Biogenex) por 20 min a temperatura ambiente. Se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano por 20 min a temperatura ambiente (Concentrated HRP label peroxidase-conjugated streptavidin, BioGenex). Para revelar se agregó una gota de cromógeno (One Step AEC solution, HK 139-50K, Biogenex) y los tejidos se contratiñieron con hematoxilina. La fracción de células positivas a cada proteína en cada tejido fue determinada por la observación directa del evaluador de acuerdo a la intensidad mostrada. Las imágenes representativas fueron capturadas con un microscopio Nikon y analizadas con el programa NIS-Elements en un ambiente Windows.

### **Actividades realizadas**

<b>Actividades realizadas</b>	
Realizar estandarización en las técnicas de fases experimentales.	<input checked="" type="checkbox"/>
Desarrollo de infección en modelo murino	<input checked="" type="checkbox"/>
Obtención de células por disgregado pulmonar	<input checked="" type="checkbox"/>
Aislamiento de RNA por TRIzol	<input checked="" type="checkbox"/>
Obtención de cDNA por RT	<input checked="" type="checkbox"/>
Inmunohistoquímica de muestras	<input checked="" type="checkbox"/>

### **Objetivos y metas alcanzadas**

<b>Objetivo</b>	<b>Metas alcanzadas</b>
Estandarización de técnicas	<input checked="" type="checkbox"/>
Establecer un modelo experimental de infección murino inducida por el virus de influenza A/H1N1 pdm09.	<input checked="" type="checkbox"/>
Caracterizar el daño pulmonar frente a la infección.	<input checked="" type="checkbox"/>
Caracterización cualitativa de proteínas de lavado bronquio alveolar	<input checked="" type="checkbox"/>
Cuantificar la expresión de IFITM-1 e IFITM-3 en tejido	<input checked="" type="checkbox"/>
Análisis de datos	

## **Resultados**

Como primer resultado de este proyecto, se estableció el correcto desarrollo del modelo de infección experimental por el virus de influenza pandémica A/H1N1 en la cepa de ratones C57BL/6, mismo que a continuación se presenta como un resumen del orden secuencial de pasos a seguir y que conforma la versión preliminar (Anexo 1) para publicación que tiene como objetivo proporcionar a los investigadores un método fácil y reproducible que permite el desarrollo de un modelo experimental de administración de partículas intranasales, incluyendo partículas virales, el desarrollo del modelo de infección, así como la optimización de la recuperación de material biológico, incluyendo la obtención de células de pulmón total, así como tejido para el análisis histológico y la recuperación de células y fracción soluble del lavado bronquioalveolar (BAL).

### Identificación y pesaje diario

- Sujetar manualmente el ratón y marcar la cola con un marcador indeleble. Utilizar una balanza de precisión para pesar al animal y registrar datos.

### Instilación intranasal

- Anestesia con isoflurano de acuerdo al peso y recipiente. Se coloca al ratón en una cámara de anestesia con gasas estériles humedecidas y se cierra firmemente. Se monitorea al animal hasta que entre en un plano profundo de anestesia. Posteriormente, se sujeta al ratón por el cuello, fijando la cabeza, y se administran 50  $\mu$ L del inóculo con una pipeta en la base de la fosa nasal. Se ajusta la velocidad de liberación para permitir que el ratón inhale sin formar burbujas. Después de la inoculación, se observa la recuperación del animal y se le devuelve a su jaula.

### Lavado bronquioalveolar (BAL)

- El procedimiento de lavado bronquioalveolar (BAL) se realiza inmediatamente después de la eutanasia de los ratones anestesiados. Se aseguran las extremidades y los incisivos del ratón, y se desinfecta la piel con etanol al 70%. Posteriormente, se hace una incisión a lo largo del cuello utilizando pinzas de disección y tijeras para retirar el tejido circundante

(músculo esternotiroideo, fascia pre-traqueal y glándulas) y visualizar la tráquea. Se introduce un catéter modificado en la tráquea, fijándolo con una sutura, y se inyectan 500  $\mu$ L de solución salina (37°C) utilizando una jeringa de insulina de 1 mL para realizar el lavado. Este proceso se repite tres veces, recuperando un volumen total de 1.5 mL. Luego, el líquido se centrifuga para obtener los pellets celulares. Los sobrenadantes se almacenan a -80 °C, y resuspender pellet celular para su conteo y análisis posterior de células.

#### Colección Pulmonar

- El procedimiento de colección pulmonar implica desinfectar la piel del ratón con etanol al 70%. Se accede a la cavidad abdominal media levantando los músculos abdominales con una pinza de disección. Se realiza un corte desde la última costilla en cada lado, cortando el músculo del diafragma ventral para permitir que los pulmones colapsen. Se retrae el xifoides caudal mientras se cortan las costillas para exponer la cavidad torácica sin dañar los pulmones. Se libera la tráquea cortando debajo de la laringe y diseccionando el tejido conectivo detrás del esófago, la tráquea y los pulmones. Finalmente, se corta el esófago y la vena cava inferior para liberar los pulmones del área del estómago.

#### Fijación pulmonar

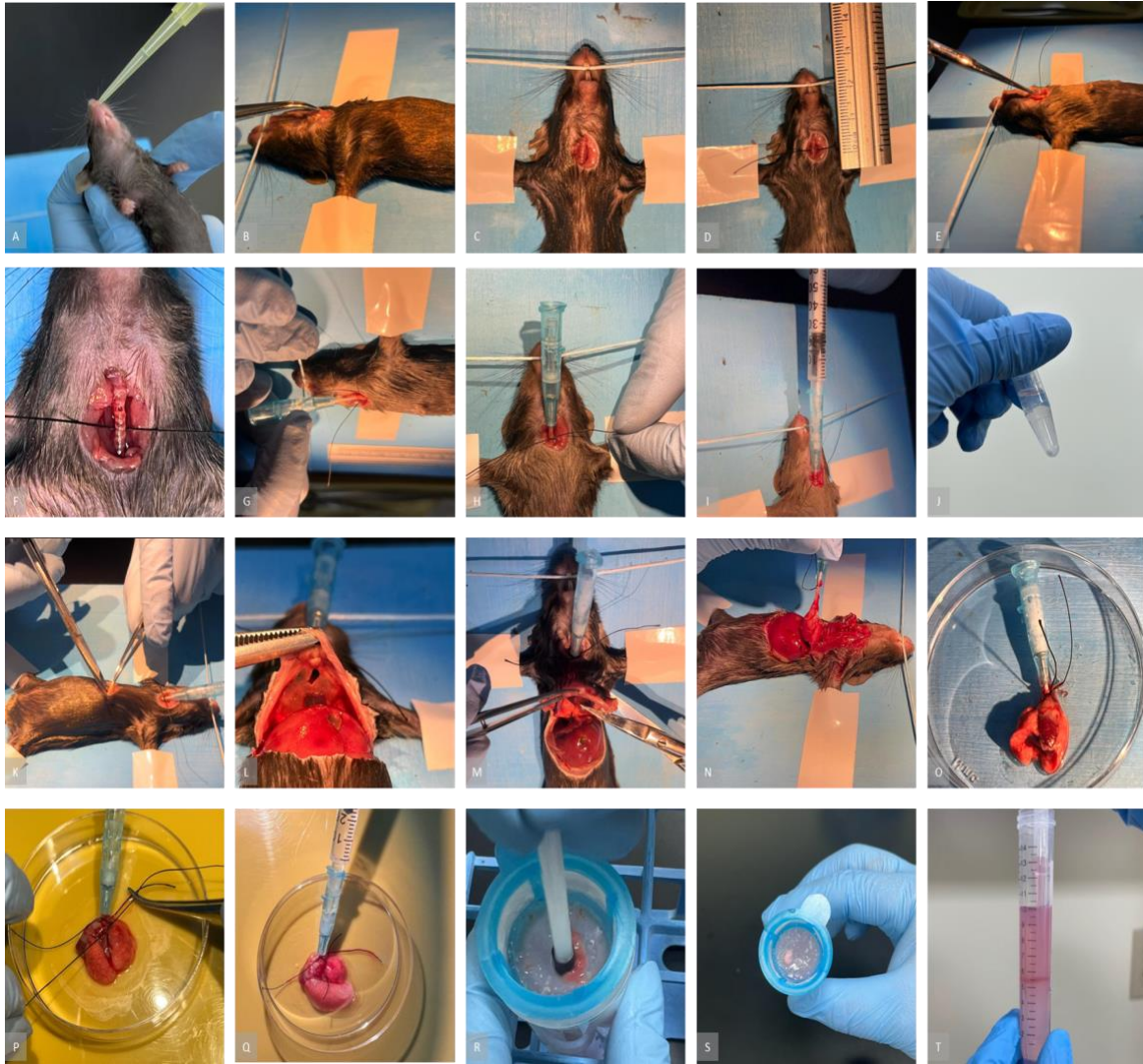
- Después de obtener los pulmones, se colocan en una caja de Petri estéril con un medio libre de suero para evitar que el tejido se seque. Se coloca una hebra de sutura de seda debajo de los pulmones, justo entre la bifurcación de la tráquea, y se ata un nudo para bloquear la fuga al pulmón derecho. Luego, se carga una jeringa de insulina con 500  $\mu$ L de formol amortiguado neutro al 10% y perfundiendo lentamente el pulmón izquierdo. Una vez que el pulmón izquierdo está fijado, se corta rápidamente el pulmón derecho y se transfiere a una nueva caja de Petri con un medio de cultivo libre de suero para su procesamiento posterior y obtención de células. El pulmón izquierdo fijado se conserva en hasta 15 mL de formol amortiguado neutro al 10% para futuros procedimientos.

### Disgregación pulmonar - Obtención celular

- Después de obtener el pulmón derecho no fijado, se corta en trozos más pequeños y se coloca en un tubo de 15 mL con medio de cultivo libre de suero y colagenasa. Se incuba durante 20 minutos a 37°C. A continuación, se disgrega mecánicamente el tejido en un separador celular, utilizando un émbolo de jeringa plana, hasta que el tejido adquiriera un color blanquecino. Se realiza enjuague con medio suplementado con suero para inactivar la colagenasa y obtener la suspensión celular. La suspensión se centrifuga para obtener un pellet celular, que luego se resuspende para hacer el conteo celular. Las células se pueden congelar o utilizar directamente para análisis adicional

### Separación celular por centrifugación de gradiente Percoll

- Para separar las células, se crea un gradiente de Percoll al 40% y 80%. Se debe de resuspender el pellet celular en 5 mL de Percoll al 40%, se agrega una capa de 5 mL de Percoll al 80% en un tubo de 15 mL, evitando la mezcla de las densidades de Percoll. Después de centrifugar a 1500 rpm durante 25 minutos sin aceleración y sin freno, se recuperan, por aspiración, las células en la interfaz de las capas de Percoll. Luego, se centrifuga nuevamente para obtener un pellet celular. Las células se resuspenden en el buffer deseado y se pueden congelar o usar directamente para análisis adicionales.

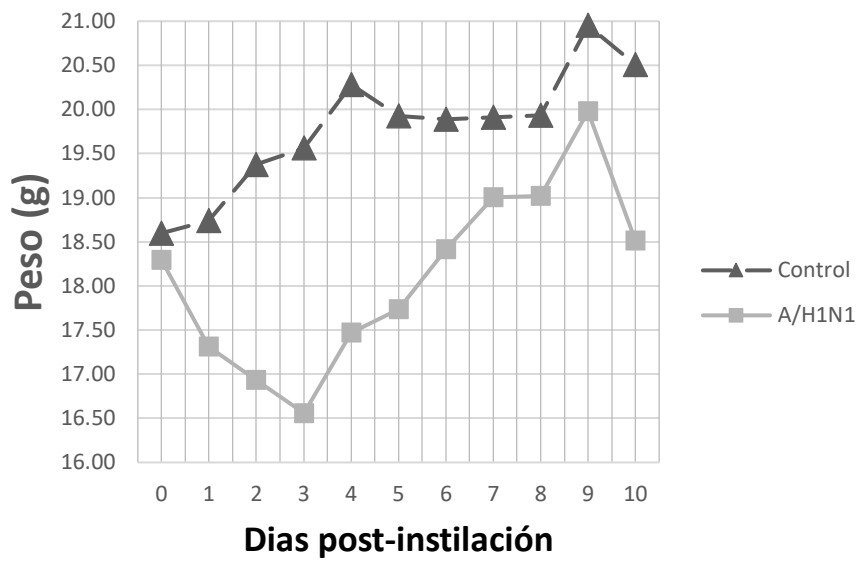


**Fig. 1. Secuencia de pasos para la instilación intranasal, obtención de BAL, células y pulmón total de ratones.** **A.** Instilación de inóculo sobre la base de la fosa nasal del ratón, **B.** Incisión en el área del cuello para exponer la tráquea, **C.** Exposición de la tráquea, sin tejido circundante, **D.** Sutura de seda bajo la tráquea, **E.** Posición de las tijeras en un ángulo de 30° para hacer la incisión entre los anillos de la tráquea, **F.** Acercamiento de la incisión traqueal con sutura debajo, **G.** Inserción de catéter en la tráquea, **H.** Nudo fijando catéter en tráquea, **I.** Inserción de jeringa de insulina para realizar BAL, **J.** Pellet de células BAL, **K.** Acceso a cavidad sujetando xifoides e incisión, **L.** Corte del diafragma que colapsa los pulmones, **M.** Corte de las costillas de los lados, **N.** Disección de los pulmones, **O.** Pulmones en caja de Petri, **P.** Nudo entre los pulmones, **Q.** Perfusión de los pulmones con formol amortiguado, **R.** Disociación mecánica de los pulmones con Colagenasa, **S.** Tejido restante con coloración blanca, **T.** Separación celular por Percoll.

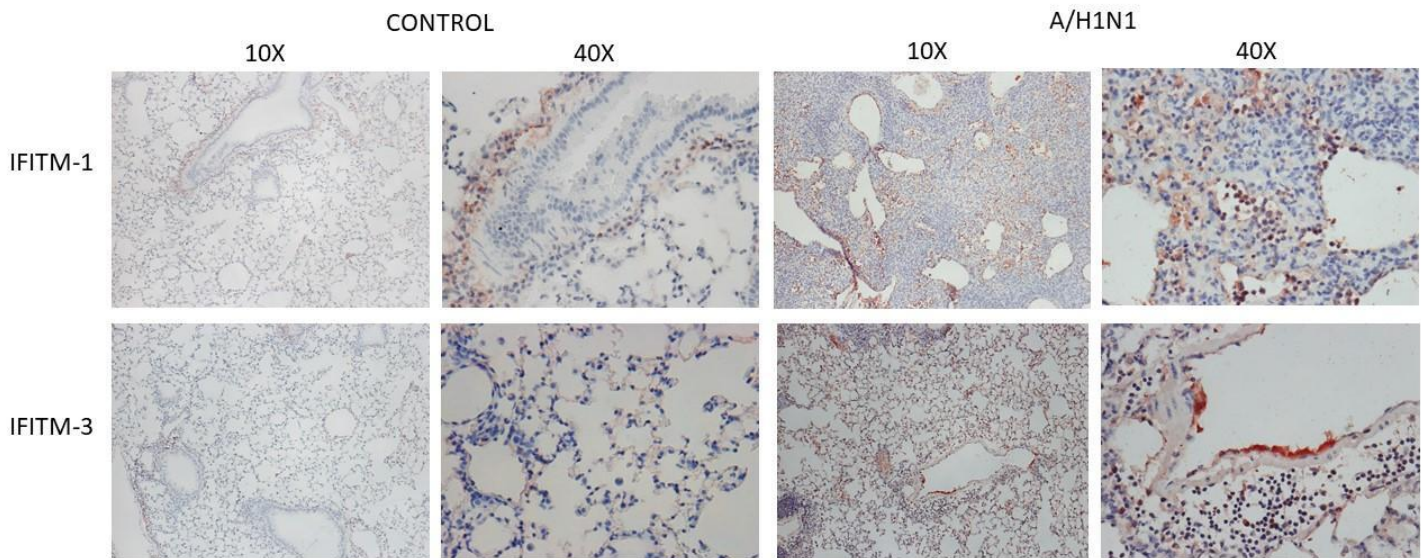
**Tabla 1.** Efectos de la infección viral en ratones: Pérdida de peso, daño en tejido pulmonar, expresión de IFITMs y presencia de proteínas virales M1 y M2.

GRUPO	ID	GDP	% de peso perdido	Daño pulmonar	IFITM-1	IFITM-3	M1	M2
CONTROL	C R1	-0.26	1.37%	Ausente	(+)	(+)	(-)	(-)
CONTROL	C R2	1.05	5.10%	Ausente	(+)	(+)	(-)	(-)
CONTROL	C R3	0.98	5.02%	Ausente	(+)	(+)	(-)	(-)
CONTROL	C R4	0.17	0.91%	Ausente	(+)	(+)	(-)	(-)
A/H1N1	I R1	-5.68	25.81%	Abundante	(+++)	(+++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R2	-5.7	28.53%	Abundante	(+++)	(+++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R3	-0.8	4.14%	Presente	(++)	(++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R4	-5.49	28.40%	Abundante	(+++)	(+++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R5	-5.04	26.72%	Abundante	(+++)	(+++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R6	-6.28	31.00%	Abundante	(+++)	(+++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R7	1	4.98%	Presente	(++)	(++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R8	-0.42	2.00%	Presente	(++)	(++)	(+)	(+)
A/H1N1	I R9	-5.22	25.29%	Abundante	(+++)	(+++)	(+)	(+)

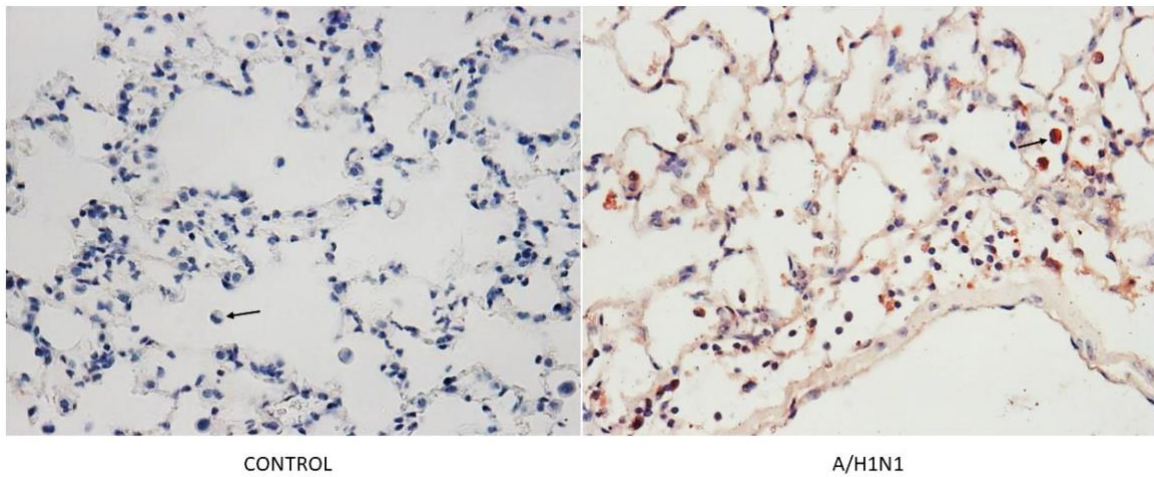
Se registraron los pesos diarios de los ratones, se calculó la ganancia de peso y el porcentaje de pérdida de peso como indicadores de la gravedad de la infección y para determinar el momento de la eutanasia. El daño pulmonar se caracterizó por la presencia de infiltrado celular inflamatorio, ruptura alveolar y daño en el epitelio. Se evaluó la ausencia, presencia y abundancia del daño tisular mediante imágenes de microscopía electrónica. La expresión de las proteínas IFITM-1 e IFITM-3 se determinó mediante inmunohistoquímica, la intensidad de expresión se clasificó como normal (+), moderada (++) o alta (+++). Para confirmar la correcta infección por vía de instilación, se estudió la presencia de las proteínas virales M1 y M2, en el tejido pulmonar, mediante IHQ y se determinó su positividad o negatividad en las muestras.



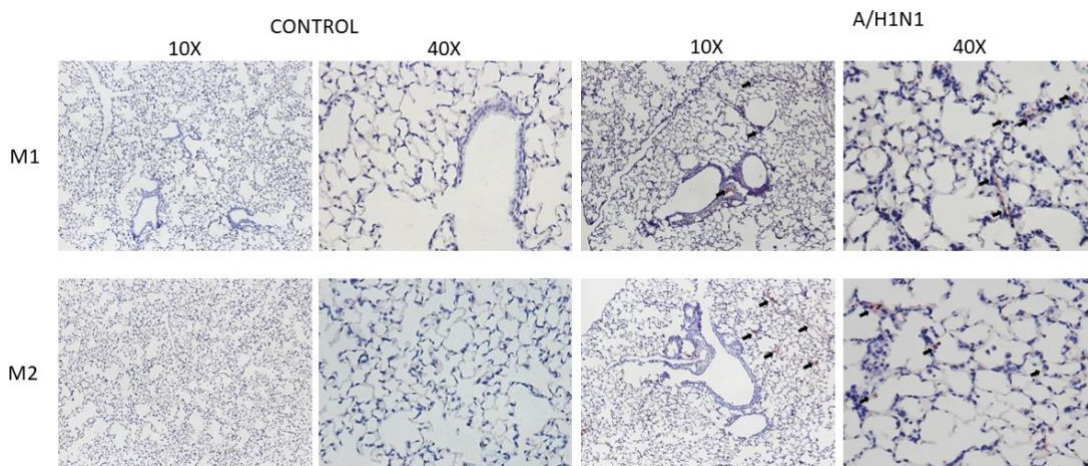
**Fig. 2. Cambios en el peso corporal de ratones durante la infección por influenza A/H1N1.** En esta figura se muestra la evolución del peso corporal de ratones a lo largo del tiempo durante la infección por influenza. Los ratones infectados con el virus experimentan una notable pérdida de peso en comparación con los ratones no infectados.



**Fig. 3. Expresión de IFITM-1 e IFITM-3 en tejido pulmonar.** La tinción inmunohistoquímica reveló la presencia de IFITM-1 e IFITM-3 en células epiteliales alveolares y bronquiales. Las células positivas para las proteínas se destacan en color rojizo oscuro con mayor concentración en células epiteliales; las imágenes se adquirieron a aumentos de 10X y 40X.



**Fig. 4. Expresión de IFITM-3 en células inflamatorias infiltradas.** Las células inflamatorias (flechas) reclutadas a una lesión de neumonía, revelan expresión de IFITM-3 en ratones infectados con A/H1N1 sugiere su posible papel en la respuesta inmunológica contra la infección. La escala de color en la figura representa la intensidad de la expresión de IFITM-3, donde los colores más intensos indican una mayor expresión.



**Fig 5. Expresión de proteínas M1 y M2 en tejido pulmonar.** La presencia de las proteínas virales M1 y M2 se evaluó mediante inmunohistoquímica en secciones de tejido pulmonar donde se observó localización positiva (flechas) de las proteínas virales en zonas alveolares, células inflamatorias infiltradas y tejido pulmonar con rasgos de inflamación.



## **Discusión**

El uso de modelos animales murinos y la técnica de instilación intranasal han sido fundamentales para comprender las alteraciones pulmonares en respuesta a la administración de sustancias. La estandarización de los modelos de daño pulmonar ha sido un desafío, pero se han establecido procedimientos generales que permiten diseñar modelos comparables y evaluar el daño pulmonar a nivel histológico, lo cual es crucial tanto para la investigación experimental como para su aplicación clínica.

La instilación intranasal se utiliza para administrar sustancias al tracto respiratorio superior e inferior, como alérgenos, fármacos y patógenos (Miller et al., 2012). Esta técnica ha demostrado ser una alternativa efectiva y no invasiva al método de infección por aerosoles, que requiere equipos costosos que no todos los laboratorios de investigación pueden permitirse (Galani et al., 2022). Además, el uso de modelos animales permite estudiar aspectos biológicos complejos y comprender los procesos a diferentes escalas, desde los signos clínicos y lesiones macroscópicas hasta los mecanismos patológicos observados a nivel microscópico (Van Hoecke et al., 2017; Hao et al., 2019).

En el contexto de la investigación sobre la influenza A/H1N1, el modelo de instilación intranasal en ratones ha sido relevante (Galani et al., 2022). Mediante la administración directa de partículas virales en solución salina a ratones previamente anestesiados por inhalación, se logra de manera eficiente una infección con el virus de influenza A/H1N1. Esta enfermedad respiratoria aguda sigue siendo una preocupación de salud pública a nivel mundial, ya que en casos graves puede llevar a insuficiencia respiratoria, dificultad respiratoria aguda, insuficiencia multiorgánica e incluso la muerte de los pacientes (Girard et al., 2010).

Los ratones son el modelo animal más utilizado en los estudios de influenza, a pesar de no ser un huésped natural de este virus. Se emplean muchas cepas de ratones, incluyendo C57BL/6 y BALB/c. En las cepas más virulentas se puede

requerir eutanasia tan pronto pasen las primeras 48 h pero la mayor mortalidad ocurre dentro de 5 a 12 post-exposición (Ruiz et al., 2017). Se ha observado que los ratones no desarrollan signos respiratorios superiores típicos como secreción nasal y tos. Sin embargo, cuando son infectados con cepas altamente patógenas del virus de la influenza, los ratones pueden experimentar pérdida de peso (Tabla 1, Fig. 2), letargo y disnea (dificultad para respirar). Estos síntomas son indicativos de enfermedad sistémica y compromiso del sistema respiratorio en los ratones.

Se realizó una tinción inmunohistoquímica de los pulmones de ratones infectados y no infectados para determinar los patrones de expresión de IFITM-1 e IFITM-3 (Fig. 3) en condiciones normales y durante la infección por influenza se encontraron en algunas células epiteliales alveolares y bronquiales, infiltrado de células inflamatorias (Fig. 4) Para asegurarnos de que se realizó correctamente la infección por instilación se determinó la presencia de las proteínas virales M1 y M2 (Fig. 5), mismas que fueron localizadas en zonas alveolares, células inflamatorias infiltradas y en tejido pulmonar con rasgos de inflamación, lo cual concuerda con estudios similares de infección con influenza (Xu et al., 2011; Bailey et al., 2012; Desai et al., 2014; Huang et al., 2011; Yu et al., 2015; Regino-Zamarripa et al., 2022). Además, los estudios han demostrado que la histopatología observada en los pulmones de los ratones infectados con cepas altamente patógenas del virus de influenza tiende a reflejar la histopatología observada en humanos (Baxter & Griffin, 2016; Aeffner, Bolon & Davis, 2015).

Se debe de tener en cuenta que aunque existen avances en técnicas *in vitro* que permiten examinar las complejidades del virus a nivel molecular, los modelos *in vivo* son necesarios para una evaluación completa de las respuestas entre un virus y su hospedero. La respuesta inmune innata y adquirida desempeña un papel crucial en el curso de una infección viral y solo pueden ser estudiadas en un modelo animal, además son necesarios para el desarrollo de estrategias terapéuticas, incluyendo el desarrollo de vacunas (Baxter & Griffin, 2016).

## **Conclusiones**

Para una comprensión completa de las interacciones entre un virus y su hospedero, aunque las técnicas *in vitro* son útiles para el estudio molecular del virus, es necesario recurrir a modelos animales. En el presente protocolo se logró establecer y reproducir el modelo de infección de virus de influenza por el método de inoculación intranasal, la cual es la ruta más comúnmente utilizada debido a su conveniencia y reproducibilidad en la mayoría de los laboratorios que no cuentan con equipos de infección por aerosol, los cuales suelen ser costosos y difíciles de acceder. Con la aparición de nuevas cepas virales con potencial pandémico, se requieren modelos animales para investigar la patogénesis y las respuestas inmunitarias, así como para desarrollar posibles terapias.

Además, es de suma importancia desarrollar modelos animales con protocolos adecuados, ya que esto permite formar profesionales capaces de llevar a cabo los experimentos de manera sencilla y con alta reproducibilidad en cualquier laboratorio. Esto asegura obtener mejores resultados y facilita la realización de investigaciones relevantes que puedan ser base en el desarrollo de la medicina traslacional.

---

## **Bibliografía**

1. Aeffner, F., Bolon, B., & Davis, I. C. (2015). Mouse models of acute respiratory distress syndrome: a review of analytical approaches, pathologic features, and common measurements. *Toxicologic Pathology*, 43(8), 1074-1092.
2. Bailey, C. C., Huang, I. C., Kam, C., & Farzan, M. (2012). Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS pathogens*, 8(9), e1002909.
3. Baxter, V. K., & Griffin, D. E. (2016). Animal models: No model is perfect, but many are useful. *Viral Pathogenesis: From Basics to Systems Biology: Third Edition*. Academic Press 125-138.

4. Brass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D. J., Xavier, R. J., Farzan, M., & Elledge, S. J. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, 139(7), 1243–1254.
5. Desai, T. M., Marin, M., Chin, C. R., Savidis, G., Brass, A. L., & Melikyan, G. B. (2014). IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathogens*, 10(4), e1004048.
6. Galani, I. E., Triantafyllia, V., Eleminiadou, E. E., & Andreakos, E. (2022). Protocol for influenza A virus infection of mice and viral load determination. *STAR Protocols*, 3(1), 101151.
7. Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M., & Kieny, M. P. (2010). The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*, 28(31), 4895–4902.
8. Hao, X.-Y., Li, F.-D., Lv, Q., Xu, Y.-F., Han, Y.-L., & Gao, H. (2019). Establishment of BALB/C mouse models of influenza A H1N1 aerosol inhalation. *Journal of Medical Virology*, 91(11), 1918–1929.
9. Hermesh, T., Moltedo, B., López, C. B., & Moran, T. M. (2010). Buying time the immune system determinants of the incubation period to respiratory viruses. *Viruses*, 2(11), 2541-2558.
10. Huang, I. C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., Brass, A. L., Ahmed, A. A., Chi, X., Dong, L., Longobardi, L. E., Boltz, D., Kuhn, J. H., Elledge, S. J., Bavari, S., Denison, M. R., Choe, H., & Farzan, M. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001258.
11. Iwasaki, A., & Pillai, P. S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 315-328.
12. Miller, M. A., Stabenow, J. M., Parvathareddy, J., Wodowski, A. J., Fabrizio, T. P., Bina, X. R., Zaldondo, L., & Bina, J. E. (2012). Visualization of

- murine intranasal dosing efficiency using luminescent *Francisella tularensis*: effect of instillation volume and form of anesthesia. *PloS One*, 7(2), e31359.
13. Organización Mundial de la Salud. (2014). Prevención y control de las infecciones respiratorias agudas con tendencia epidémica y pandémica durante la atención de salud. Directrices I. Organización Mundial de la Salud.
  14. Peteranderl, C., Herold, S., & Schmoldt, C. (2016). Human Influenza Virus Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), 487–500.
  15. Pulendran, B., & Maddur, M. S. (2015). Innate immune sensing and response to influenza. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 386, 23–71.
  16. Regino-Zamarripa, N. E., Ramírez-Martínez, G., Jiménez-Álvarez, L. A., Cruz-Lagunas, A., Gómez-García, I. A., Ignacio-Cortés, S., Márquez-García, J. E., Pacheco-Hernández, L. M., Ramírez-Noyola, J. A., Barquera, R., Mendoza-Milla, C., Luna-Rivero, C., Domínguez-Cherit, J. G., Ramírez-Rangel, R., Rodríguez-Reyna, T. S., Hernández-Cárdenas, C. M., Choreño-Parra, J. A., León-Ávila, G., & Zúñiga, J. (2022). Differential Leukocyte Expression of IFITM1 and IFITM3 in Patients with Severe Pandemic Influenza A(H1N1) and COVID-19. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 42(8), 430–443.
  17. Ruiz, S. I., Zumbrun, E. E., & Nalca, A. (2017). Animal models of human viral diseases. *Animal Models for the Study of Human Disease*, 853-901.
  18. Seth J. Sullivan, MD; Robert M. Jacobson, MD; Walter R. Dowdle, PhD; and Gregory A. Poland, . (2010). 2009 H1N1 Influenza. *Medisur*, 8(1), 68-80.
  19. Talledo, M., & Zumaeta, K. (2009). Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Revista peruana de biología*, 16(2), 227-238.
  20. Teijaro, J. R., Walsh, K. B., Rice, S., Rosen, H., & Oldstone, M. B. (2014). Mapping the innate signaling cascade essential for cytokine storm during

- influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10), 3799-3804.
21. Tscherne, D. M., & García-Sastre, A. (2011). Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 6-13.
  22. Van Hoecke, L., Job, E. R., Saelens, X., & Roose, K. (2017). Bronchoalveolar Lavage of Murine Lungs to Analyze Inflammatory Cell Infiltration. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (123), 55398.
  23. Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza. (2010). Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *New England Journal of Medicine*, 362(18), 1708-1719.
  24. Xu, L., Bao, L., Li, F., Lv, Q., Ma, Y., Zhou, J., Xu, Y., Deng, W., Zhan, L., Zhu, H., Ma, C., Shu, Y., & Qin, C. (2011). Adaption of seasonal H1N1 influenza virus in mice. *PLoS One*, 6(12), e28901.
  25. Yu, M., Qi, W., Huang, Z., Zhang, K., Ye, J., Liu, R., Wang, H., Ma, Y., Liao, M., & Ning, Z. (2015). Expression profile and histological distribution of IFITM1 and IFITM3 during H9N2 avian influenza virus infection in BALB/c mice. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(4), 505–514.