



# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

## **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Tesis:  
**“Estudio de la respuesta antiviral de los eosinófilos contra SARS-  
CoV-2”**

Presenta:  
**Ing. Bt. Ararat Amezcua Arroyo**

Para obtener el grado de:  
**Maestra en Ciencias Biológicas**

Director:  
**Dr. Alejandro Bravo Patiño**  
Profesor-Investigador Titular  
FMVZ-UMSNH

Codirectora:  
**Dra. Ricarda Cortés Vieyra**  
Investigadora Posdoctoral por México, SECIHTI  
FMVZ-UMSNH

Morelia, Michoacán, febrero del 2026

## *Agradecimientos*

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la tutoría del Dr. Alejandro Bravo Patiño y la cotutoría de la Dra. Ricarda Cortés Vieyra a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, así como al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología por facilitarnos las instalaciones y los materiales necesarios para la realización de este trabajo.

Asimismo, expreso mi agradecimiento al apoyo a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el otorgamiento de la beca nacional No. CVU: 134694, la cual hizo posible llevar a cabo mis estudios de maestría.

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi asesor de tesis, *Dr. Alejandro Bravo Patiño*, por su entrega incondicional a la enseñanza, su paciencia y constante guía a lo largo de este camino formativo. Su compromiso con la ciencia y con mi crecimiento académico fue un pilar fundamental en esta etapa.

Agradezco de manera especial a la *Dra. Ricarda Cortes Vieyra* por brindarme las herramientas intelectuales, la confianza y el valor necesarios para enfrentar el gran reto que implica cursar un posgrado. Asimismo, reconozco con gratitud a la *Dra. Elvira Núñez Anita* quien fue la primera en orientarme, motivarme y acompañarme en la decisión de emprender el camino de la maestría. Mi reconocimiento al *Dr. Marcos Cajero Juárez* por enseñarme lo simple que pude ser llevar la ciencia con pasión.

*A mi familia*, motor y sustento de mi vida, les debo más de lo que estas páginas pueden contener. Su amor, apoyo y sacrificio han sido la base sobre la cual he construido cada uno de mis logros. Sin ellos, nada de lo que hoy soy habría sido posible.

Finalmente, agradezco profundamente a mis amigos y compañeros que formaron parte de este proceso. A *Xally*, por su amistad verdadera y su apoyo incondicional, y a *Abraham*, por su templanza, confianza y lealtad.

## CONTENIDO

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN .....                                                                                                                                | 3  |
| ABSTRACT .....                                                                                                                               | 4  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                        | 6  |
| 2. MARCO TEÓRICO.....                                                                                                                        | 7  |
| 2.1 Fisiopatología de COVID-19 grave .....                                                                                                   | 7  |
| 2.2 Proteínas codificadas en el genoma del virus SARS-CoV-2.....                                                                             | 7  |
| 2.3 Proteínas estructurales de SARS-CoV-2 importantes para el proceso de infección y para el desarrollo de la enfermedad.....                | 8  |
| 2.4 Inmunidad innata contra el virus SARS-CoV-2 .....                                                                                        | 10 |
| 2.5 Características principales de los eosinófilos .....                                                                                     | 10 |
| 2.6 Estallido respiratorio a través de NADPH, un mecanismo implicado en la eliminación de virus .....                                        | 12 |
| 3. ANTECEDENTES.....                                                                                                                         | 16 |
| 3.1 Respuesta antiviral de los eosinófilos.....                                                                                              | 16 |
| 3.2 Comportamiento de los eosinófilos durante la infección por SARS-CoV-2.....                                                               | 16 |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....                                                                                                                        | 18 |
| 5. HIPÓTESIS .....                                                                                                                           | 18 |
| 6. OBJETIVO GENERAL .....                                                                                                                    | 18 |
| 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                                | 18 |
| 8. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                | 19 |
| 9. RESULTADOS.....                                                                                                                           | 22 |
| 9.1 Estandarización de la purificación de eosinófilos.....                                                                                   | 22 |
| 9.2 Determinación de estallido respiratorio en células polimorfonucleares por el estímulo viral (número de partículas de SARS-CoV-2-I) ..... | 23 |
| 9.3 Determinación de la expresión del receptor TLR-7 en eosinófilos estimulados con SARS-CoV-2 .....                                         | 25 |
| 9.4 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno en eosinófilos estimulados con SARS-CoV-2 .....                             | 27 |
| 9.5 Cuantificación de la expresión del gen <i>IFN-β</i> en eosinófilos estimulados con el virus SARS-CoV-2.....                              | 30 |
| 10. DISCUSIÓN.....                                                                                                                           | 32 |

|      |                                                                                                                                                                    |    |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11.  | CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                                   | 38 |
| 12.  | BIBLIOGRAFÍA.....                                                                                                                                                  | 39 |
| 13.  | ANEXOS .....                                                                                                                                                       | 46 |
| 13.1 | Oficio de la aprobación del Reglamento Interno y de Bioseguridad de la Universidad<br>Michoacana de San Nicolás de Hidalgo para el proyecto de investigación. .... | 46 |

## RESUMEN

La enfermedad por *Corona Virus Disease* 2019 (COVID-19), provocada por el Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), desencadenó una pandemia con graves repercusiones sanitarias y sociales a nivel mundial. Aunque en la mayoría de los casos la replicación viral se limita a las vías respiratorias superiores, con ausencia de síntomas o enfermedad moderada, en ciertos individuos la infección progresa hacia una neumonía grave. La comprensión de los mecanismos inmunológicos que determinan la variabilidad clínica sigue siendo limitada, no obstante, se ha reportado que la activación adecuada de la respuesta inmune innata resulta esencial para evitar la enfermedad grave. En este contexto, los eosinófilos (EOs), leucocitos de la inmunidad innata, tradicionalmente asociados a respuestas alérgicas y parasitarias, mostraron un comportamiento atípico en pacientes COVID-19. Diversos reportes clínicos evidenciaron que la eosinopenia sostenida (recuento persistente de EOs en sangre periférica  $<0.01 \times 10^9/L$ ) se asocia con la gravedad de COVID-19 y con un mal pronóstico de la enfermedad, mientras que el incremento de EOs posterior a la eosinopenia sostenida en el curso de la enfermedad grave, se relaciona con la mejora clínica, lo que sugiere un papel potencialmente protector de los EOs en la infección por SARS-CoV-2. Por otro lado, estudios realizados en modelos murinos infectados con virus respiratorios, incluidos el virus respiratorio sincitial, el virus de la influenza y SARS-CoV-2, han sugerido la función protectora de los EOs a través de la restricción de la replicación viral. Sin embargo, en el caso de SARS-CoV-2 se desconocen los mecanismos de eliminación del virus tanto en ratones como en células humanas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si los EOs de humanos contribuyen a la eliminación del virus SARS-CoV-2 mediante mecanismos efectores como estallido respiratorio y la expresión de genes con funciones antivirales. Para ello, se obtuvieron muestras de 10 ml de sangre periférica de individuos sanos, quienes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética de la UMSNH. Inmediatamente después, se purificaron los EOs mediante separación inmunomagnética, obteniendo muestras de células viables con una pureza de entre el 80 al 98%. Además, la identidad celular fue confirmada por citometría de flujo a través de marcadores de superficie específicos de EOs (CD45<sup>+</sup>/Siglec-8<sup>+</sup>) y su morfología característica fue evaluada por tinción con hematoxilina y eosina. Posteriormente, las células fueron estimuladas con partículas de SARS-CoV-2 inactivadas por calor (iSARS-CoV-2) de AcroMetrix<sup>TM</sup>. Los resultados de estimulación de EOs con iSARS-

CoV-2 por 2 h, mostraron un incremento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), probablemente a través de la activación del complejo de fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) oxidasa. Además, tras 20 h de estimulación, se observó una mayor expresión del receptor tipo Toll 7 (TLR-7), implicado en el reconocimiento del ARN viral y un aumento significativo de la expresión del gen de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), una citocina inmunomoduladora con funciones antivirales. En conjunto, nuestros datos sugieren que los EOs de humano contribuyen a la eliminación del virus SARS-CoV-2 mediante la generación de ROS y mediante la producción de IFN- $\beta$ , probablemente a través de la activación del receptor TLR-7 y de su vía de señalización.

Palabras clave: COVID-19, eosinófilos, inmunidad innata, ROS, TLR-7, IFN- $\beta$ .

### **ABSTRACT**

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), led to a global pandemic with profound health and social consequences. In most individuals, viral replication remains confined to the upper respiratory tract, resulting in asymptomatic or mild disease. However, in a subset of patients, infection progresses to severe pneumonia. The immunological mechanisms underlying this marked clinical heterogeneity are still not fully understood, although an effective and timely activation of the innate immune response has been recognized as a key factor in preventing severe disease outcomes.

Within this context, eosinophils (EOs), innate immune leukocytes classically associated with allergic and parasitic responses, have displayed an unexpected behavior in patients with COVID-19. Clinical evidence has shown that sustained eosinopenia (persistent peripheral blood EOs counts  $< 0.01 \times 10^9/L$ ) correlates with disease severity and poor prognosis. In contrast, the recovery of EOs counts following sustained eosinopenia during severe disease has been associated with clinical improvement, suggesting a potentially protective role for EOs during SARS-CoV-2 infection.

In parallel, studies using murine models of respiratory viral infections including respiratory syncytial virus, influenza virus, and SARS-CoV-2, have proposed a protective function for EOs through the limitation of viral replication. Despite these observations, the specific mechanisms by which EOs contribute to SARS-CoV-2 clearance remain largely undefined, particularly in

human cells. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether human EOs participate in *SARS-CoV-2* elimination through effector mechanisms such as respiratory burst activity and the induction of antiviral gene expression.

Peripheral blood samples (10mL) were obtained from healthy donors after informed consent, in accordance with protocols approved by the Bioethics Committee of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). EOs were isolated by immunomagnetic separation, yielding viable cell populations with purities ranging from 80% to 98%. Cell identity was confirmed by flow cytometry using EO-specific surface markers (CD45<sup>+</sup>/Siglec-8<sup>+</sup>), and characteristic morphology was verified by hematoxylin and eosin staining. Isolated EOs were stimulated with heat-inactivated *SARS-CoV-2* particles (iSARS-CoV-2; AcroMetrix™).

Stimulation with iSARS-CoV-2 for 2 h resulted in a significant increase in reactive oxygen species (ROS) production likely mediated by activation of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex. At later time points (20 h), EOs exhibited increased expression of Toll-like receptor 7 (TLR-7), a sensor of viral RNA, together with a significant upregulation of interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) gene expression, a key antiviral and immunomodulatory cytokine.

Taken together, these findings support the notion that human eosinophils contribute to *SARS-CoV-2* elimination through ROS generation and IFN- $\beta$  production, potentially mediated by TLR-7 activation and its downstream signaling pathway.

## 1. INTRODUCCIÓN

*COVID-19* (por *Coronavirus disease 2019*), es la enfermedad humana provocada por la infección con el coronavirus de tipo 2, causante del síndrome respiratorio agudo grave (*SARS-CoV-2*). Esta enfermedad puede manifestar un gran espectro de síntomas clínicos con progresión a falla multiorgánica, acompañada de un proceso inflamatorio exacerbado en los casos más graves (Zaim *et al.*, 2020). Gracias a la ciencia y tecnología se desarrollaron técnicas de diagnóstico, vacunas y tratamientos en tiempo récord, que permitieron la mitigación de la pandemia COVID-19. Sin embargo, todavía existen personas vulnerables a la enfermedad grave, principalmente por la edad y/o por la presencia de comorbilidades, así como por el surgimiento de nuevas variantes del virus (Trøseid & Arribas, 2023).

La correcta activación del sistema inmunológico, que implica la eliminación del virus y la protección del huésped, es esencial para evitar el desarrollo de la enfermedad grave. Nuestro interés radica en el estudio de eosinófilos (EOs), células blancas del sistema inmunológico, por su multifuncionalidad y por su comportamiento atípico en COVID-19. La disminución de EOs en sangre periférica de pacientes COVID-19, fue un factor de predicción para un mal pronóstico (Du *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020), mientras que el incremento de EOs en sangre correlacionó con la recuperación (Cortés-Vieyra *et al.*, 2021). Además, a causa de la difícil purificación de los EOs, por ser leucocitos que se encuentran en muy baja proporción, existe una limitada investigación de estas células en humanos (Megías M, 2023).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Fisiopatología de COVID-19 grave

COVID-19 es la tercera enfermedad humana causada por coronavirus en los últimos veinte años, sucediendo al síndrome respiratorio agudo grave (SARS) en 2002 y al síndrome respiratorio de oriente medio (MERS) en 2012 (Gusev *et al.*, 2022).

Las manifestaciones de COVID-19 van desde un estado asintomático hasta el desarrollo de la enfermedad grave caracterizada por neumonía y la muerte (Merad *et al.*, 2022). La neumonía inducida por SARS-CoV-2 ocurre en dos fases: La fase primaria o viral se caracteriza por la replicación del virus que tiene como consecuencia el daño de tejidos. El grado de daño determina la patogénesis de la fase secundaria, que se caracteriza por el reclutamiento de células inmunes efectoras que causan inflamación local y sistémica que puede persistir incluso después de la eliminación del virus. El desarrollo de la enfermedad pulmonar está asociado con la permeabilidad vascular excesiva, conduciendo a la formación de microtrombos, además a un rango de síntomas sistémicos que pueden incluir: (i) disfunción olfatoria (ii) síntomas gastrointestinales y (iii) disfunción cardíaca, (iiii) disfunción hepatobiliar (iiiii) disfunción renal (Merad *et al.*, 2022).

La patogénesis de manifestaciones extrapulmonares es multifactorial como resultado del daño que provoca el virus de forma directa en los tejidos, así como por la liberación de citocinas, daño de tejidos inducido por autoanticuerpos y daño vascular. Aunque varios factores de riesgo se han asociado con el desarrollo de COVID-19 grave, la fisiopatología que contribuye a la gravedad no está del todo comprendida (Merad *et al.*, 2022).

### 2.2 Proteínas codificadas en el genoma del virus SARS-CoV-2

El agente causal de COVID-19, SARS-CoV-2, es un virus envuelto que posee un genoma de ARN monocatenario positivo. Perteneció al orden de *Nidovirales*, a la familia *Coronaviridae*, a la subfamilia *Coronavirinae* y al género de *betacoronavirus* (Hu *et al.*, 2021). La disposición de la información genética del SARS-CoV-2 es similar a la de otros *betacoronavirus*. El genoma de SARS-CoV-2 está constituido por 14 marcos de lectura abiertos u ORF's (por sus siglas en inglés, *open reading frames*) que codifican para 29 proteínas virales, incluyendo regiones que codifican para proteínas no estructurales, NSP's (por sus siglas en inglés, *nonstructural proteins*), proteínas accesorias y proteínas estructurales. ORF1a y ORF1b codifican 16 NSPs (NSP1-NSP16) que se requieren para la síntesis del RNA viral. Hay 9 proteínas accesorias (3a,

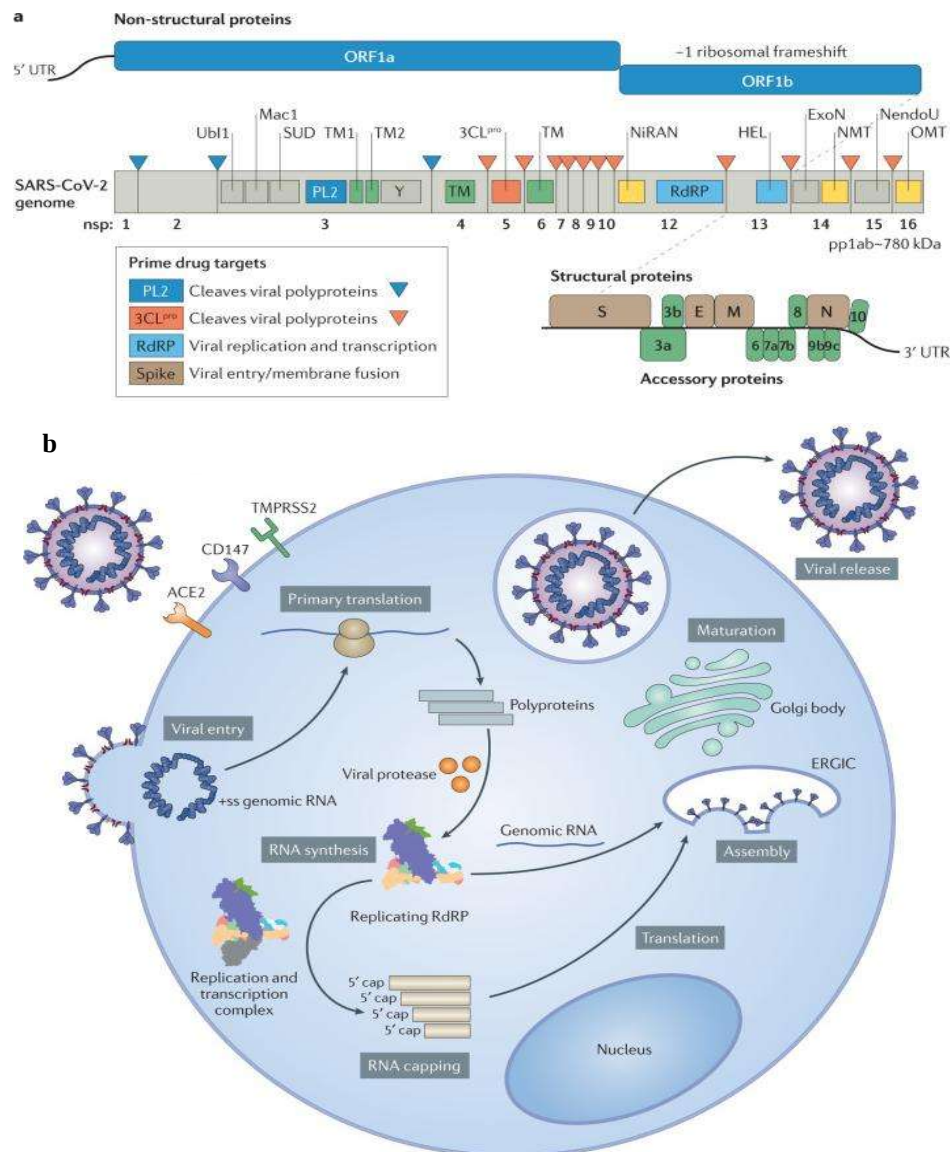
3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c, y 10) codificadas en 8 ORFs, las cuales tienen funciones importantes en la interacción de SARS-CoV-2 con las células del huésped, ya que ayudan al virus a evadir el sistema inmune y a aumentar su virulencia. Además, hay 4 proteínas estructurales esenciales para el ensamblaje del virus y para el proceso de infección de la célula huésped, codificadas en 4 ORF's, que incluyen la proteína de espiga (S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N) (**Figura 1a**) (Bai et al., 2022).

### **2.3 Proteínas estructurales de SARS-CoV-2 importantes para el proceso de infección y para el desarrollo de la enfermedad**

De las cuatro proteínas estructurales del SARS-CoV-2, solo se ha determinado la estructura tridimensional de la proteína S y dos dominios de la proteína N. Las estructuras de la proteína M y E no se han determinado, debido a que se complica el análisis de sus dominios transmembranales. Por otro lado, se sabe que la proteína S es una glucoproteína transmembranal que forma homotrímeros que sobresalen de la superficie viral, media la adherencia del virus a los receptores de superficie de la célula hospedera y promueve la subsecuente entrada del virus (**Figura 1 b**). De forma similar a su homólogo SARS-CoV y a otro tipo de virus que contienen proteínas que fusionan su membrana con la de la célula huésped, la proteína S del SARS-CoV-2 está compuesta por dos subunidades funcionales: un dominio N-terminal (S1) y un dominio C-terminal (S2). Además, contiene dos sitios de corte entre los límites de S1/S2 que son esenciales para entrada del virus de forma eficiente dentro de la célula blanco. La subunidad S2 contiene el dominio de unión al receptor, llamado RBD (por sus siglas en inglés, **receptor-binding domain**), que es responsable de la unión del virus a los receptores celulares, tales como la enzima convertidora de angiotensina de tipo 2 (ACE2). La subunidad S1 es responsable de mediar el proceso de fusión de las membranas (Walls *et al.*, 2020).

De forma similar a la proteína M, la proteína N es una proteína estructural abundante en SARS-CoV-2. La función de la proteína N es unir el genoma del virus para constituir la nucleocápside. Este complejo de ribonucleoproteína es esencial para guardar el ARN en una conformación ordenada para la replicación y transcripción. Además, la proteína N es establemente conservada y altamente inmunogénica, además de ser menos propensa a mutar durante la infección. Por lo

tanto, se considera un marcador molecular de diagnóstico y un objetivo profiláctico (Liang et al., 2020). También la proteína N promueve la activación del inflamosoma para inducir hiperinflamación durante la infección por SARS-CoV-2 (Pan et al., 2021).



**Figura 1. a) Organización del genoma de SARS-CoV-2 y proceso infeccioso.** Los dominios funcionales se muestran con rectángulos. La primera parte del RNA genómico de SARS-CoV-2 codifica para proteínas no estructurales (NSPs), el cual puede ser directamente traducido a dos poliproteínas que posteriormente son procesadas por proteasas virales para generar 16 NSPs que formarán la maquinaria de replicación y transcripción. La segunda parte del RNA genómico codifica para proteínas accesorias y para las proteínas estructurales: de espiga (S), de membrana (M), de la envoltura (E) y de la nucleocápsida (N). **b) Ciclo de replicación de SARS-CoV-2.** Incluye la entrada del virus a la célula huésped a través de la proteína ACE2, la replicación del genoma, la transcripción, el ensamblaje y la liberación del virus. Tomada de Yang y Rao (2021).

## 2.4 Inmunidad innata contra el virus SARS-CoV-2

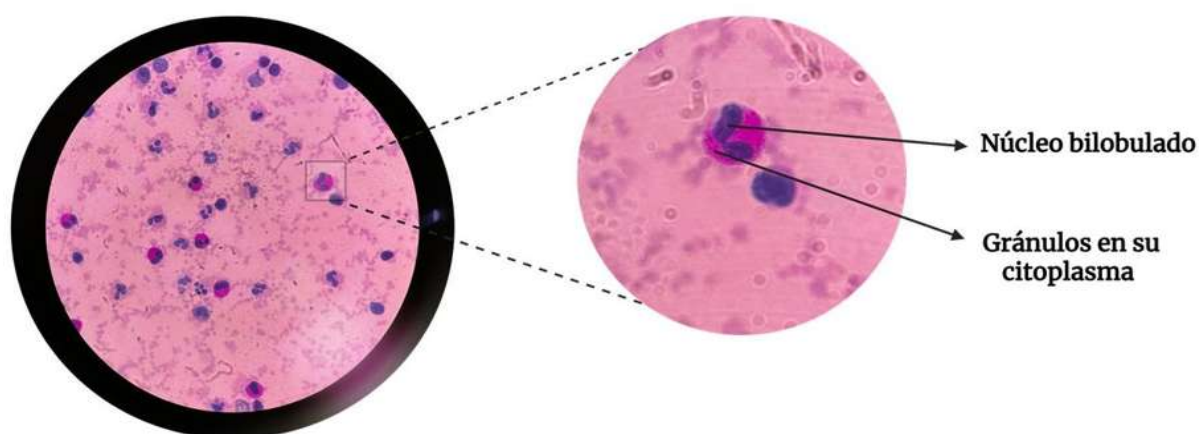
La respuesta inmune innata tiene tres propósitos principales: 1) Restringir la replicación viral dentro de las células infectadas, 2) Crear un estado antiviral en el ambiente local del tejido infectado, que incluye el reclutamiento de células efectoras de la inmunidad innata y 3) Activar la inmunidad adaptativa (Sette & Crotty, 2021). En una infección viral común, el sistema inmune innato rápidamente reconoce la infección e induce la expresión de interferones (IFN) de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) y de moléculas relacionadas. Esto puede ocurrir dentro de un par de horas posteriores al inicio de la infección.

Por otro lado, cualquier virus que puede causar enfermedad en humanos debe tener, por lo menos, un mecanismo de evasión del sistema inmune. SARS-CoV-2 es capaz de evadir el reconocimiento de la inmunidad innata y de bloquear la señalización e inducción de interferón (IFN). En consecuencia, niveles bajos de IFN-I o IFN-III son detectados en los pulmones y en sangre periférica de individuos infectados con SARS-CoV-2 en comparación con individuos infectados con otros virus respiratorios (Merad et al., 2022). Adicionalmente, COVID-19 es acompañada por un significativo incremento en el número de neutrófilos y una disminución de otras células del sistema inmune, tanto en pulmones como en sangre periférica, que incluyen células dendríticas, linfocitos y eosinófilos (EOs) (Cortés-Vieyra *et al.*, 2021; Merad *et al.*, 2022).

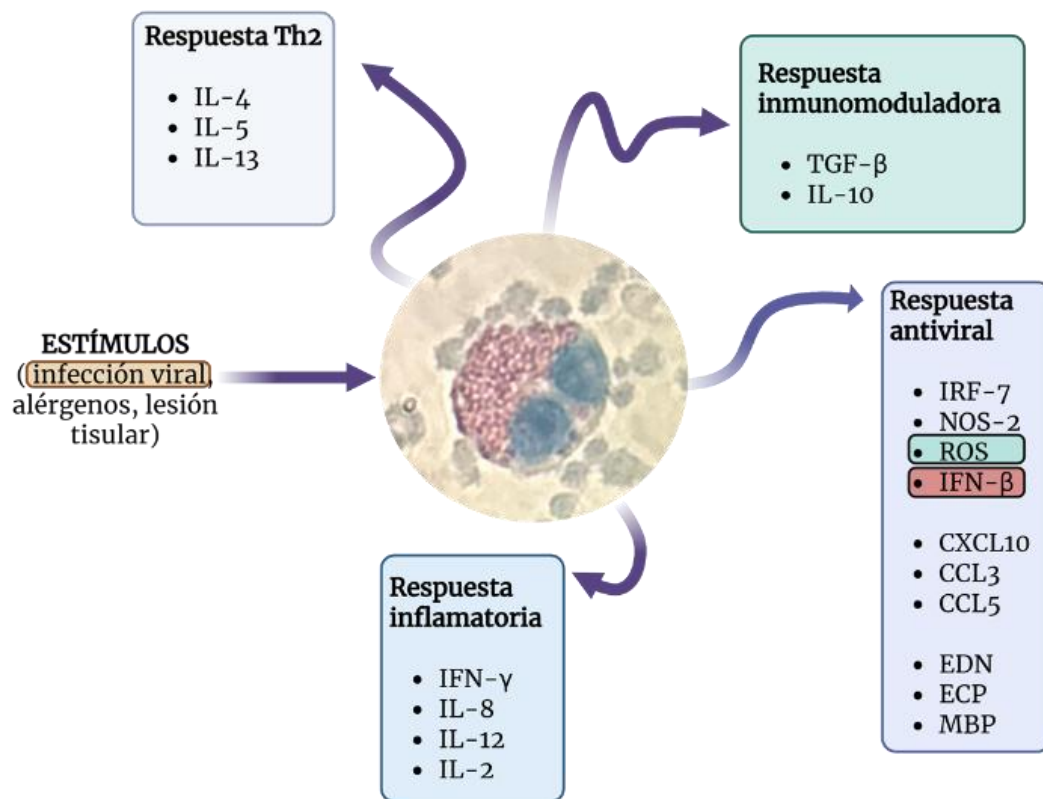
## 2.5 Características principales de los eosinófilos

Los EOs son leucocitos de la inmunidad innata, poseen características morfológicas que los distinguen, su núcleo bilobulado y gránulos en su citoplasma (**Figura 2**). Los EOs generalmente se les conoce por estar mayormente involucrados en enfermedades alérgicas y en la protección contra parásitos a través de la liberación de citocinas/quimiocinas, mediadores, péptidos antimicrobianos, trampas extracelulares de EOs (EETs, por sus siglas en inglés, *Eosinophil Extracellular Traps*), neurotoxinas y cuatro proteínas catiónicas derivadas de sus gránulos: la proteína básica principal (MBP por sus siglas en inglés, *major basic protein*), la peroxidasa de EOs (EPO por sus siglas en inglés, *eosinophil peroxidase*), la proteína catiónica eosinofílica (ECP por sus siglas en inglés, *eosinophilic cationic protein*,) y la neurotoxina derivada de EOs (EDN por sus siglas en inglés, *eosinophil-derived neurotoxin*) (Jacobsen et al., 2014; Jacobsen et al., 2011). Además, los EOs tienen otras funciones que incluyen: la regulación de la homeostasis, el metabolismo de glucosa en el tejido adiposo, la regeneración de tejidos, la

autoinmunidad, la defensa del huésped contra infecciones virales y bacterianas, la regulación inmunológica a través del balance de células T cooperadoras (Th por sus siglas en inglés, *T-helper cells*), la estimulación de células T al actuar como células presentadoras de antígeno y el aumento de la respuesta inmune adaptativa contra el cáncer, por lo cual dependiendo del contexto celular pueden contribuir a respuestas Th2 mediante la IL-4, IL-5 e IL-13; ejercer funciones inmunoregulatoras a través de TGF- $\beta$  e IL-10; o bien, promover inflamación secretando citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-12 e IL-6. Más importante para este trabajo, en la respuesta antiviral, dónde expresan moléculas como IRF-7, NOS2, ROS e IFN- $\beta$  o la producción de quimiocinas (CXCL10, CCL3 y CCL5) que favorecen el reclutamiento de linfocitos T y células NK (**Figura 3**) (Blomberg *et al.*, 2023; Isobe *et al.*, 2012; Macchia *et al.*, 2023).



**Figura 2. Microfotografía de EOs aislados por técnica inmunomagnética.** Se muestran características principales de los EOs teñidos con H&E, núcleo bilobulado y gránulos citoplasmáticos.



**Figura 3. Plasticidad funcional de los EOs en distintos contextos inmunológicos.** Los EOs tienen cualidades que las distinguen como la participación en repuestas TH2, inmunoregulatoras, inflamatorias y antivirales.

## 2.6 Estallido respiratorio a través de NADPH, un mecanismo implicado en la eliminación de virus

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*) son moléculas altamente tóxicas, producidas por el complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP en su forma oxidada y NADPH en su forma reducida), y por otras enzimas (**Figura 4**). La producción de ROS, también conocido como estallido respiratorio, es esencial para la defensa inmunitaria innata contra infecciones bacterianas y fúngicas, sin embargo, también se ha visto la activación de este complejo por infecciones virales como la infección por el virus de la influenza. El papel descrito de estallido respiratorio en la eliminación de virus puede ser mediante destrucción directa de la membrana viral y la desnaturalización de las proteínas virales. Así mismo, las ROS activan vías inflamatorias como la vía de activación

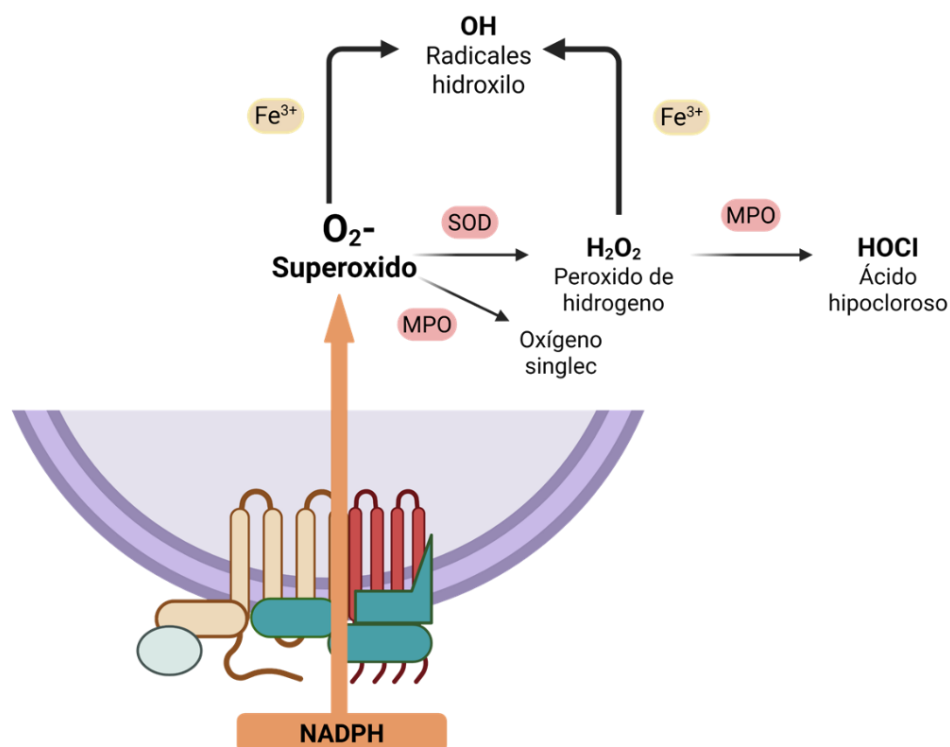
del factor transcripcional NF- $\kappa$ B, que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, promoviendo un mecanismo indirecto de ataque (Giang T. Nguyen *et al.*, 2017).

Las ROS tiene una importancia dual: por un lado la producción de especies que dañan las membranas, proteínas y ADN de los patógenos mediante daño oxidativo y, por otro lado, el potencial daño tisular del huésped por su producción descontrolada, la cual puede causar inflamación excesiva y enfermedades autoinmunes (Giang T. Nguyen *et al.*, 2017). De forma importante, se reportó que la activación del complejo NADPH puede inducir la expresión del Factor Tisular en células inmunitarias, promoviendo un estado procoagulante que podría desencadenar microtrombosis en pacientes COVID-19, proveyendo así la severidad de la enfermedad (Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J., 2017).

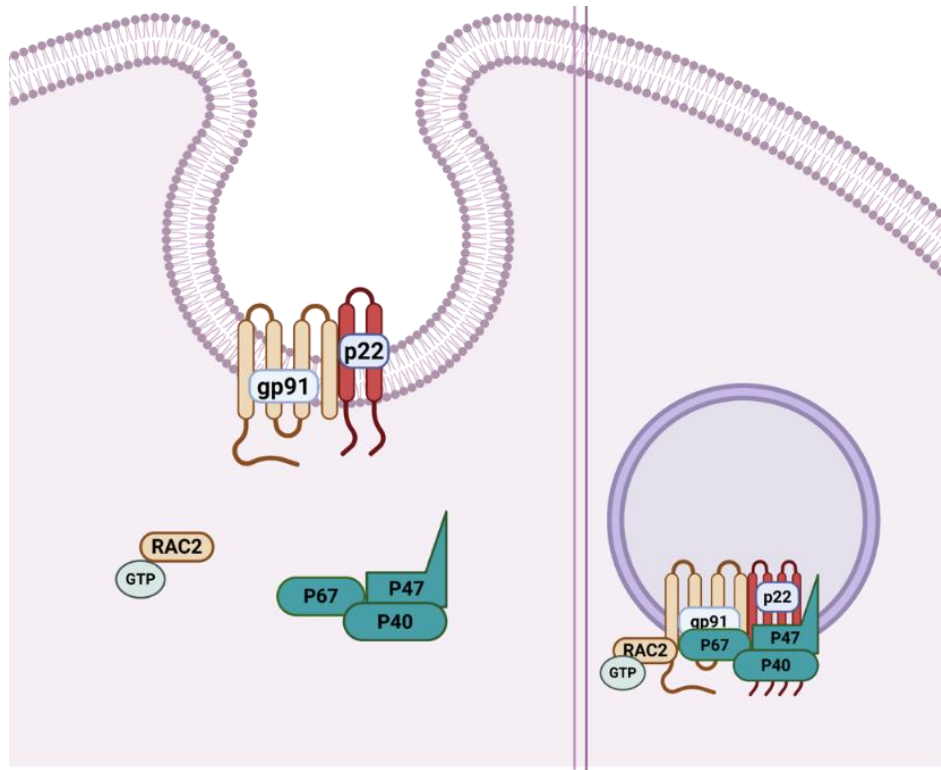
Los neutrófilos son las células inmunitarias que generan grandes cantidades de ROS en respuesta a infecciones, utilizando los fagosomas para dirigir la liberación de ROS hacia los patógenos, limitando así el daño tisular (Lambeth, 2004). Los compartimentos de ROS en fagosomas permite dirigir el ataque oxidativo a los patógenos sin afectar el tejido sano circundante (Lambeth, 2004). Mecanismos como la señalización intracelular, aseguran que la activación solo ocurra en el contexto de una infección activa. Para esto es indispensable el proceso de activación de complejo de producción de ROS mediante el reconocimiento de patógenos por receptores, generalmente presentes en la superficie celular, que conducen a la señalización intracelular (Futosi *et al.*, 2013).

Para poder desempeñar su actividad de transferencia de electrones, el complejo NADPH oxidasa, también referido como la oxidasa del fagocito (phox), debe ensamblarse con sus cinco componentes (las proteínas gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>) a la proteína Rac2. Las proteínas gp91<sup>phox</sup> y gp22<sup>phox</sup>, forman la estructura catalítica del complejo, conocido como flavocitocromo b558 (Cytb<sub>558</sub>). En estado inactivo Cytb<sub>558</sub> reside en la membrana de los fagosomas, en vesículas secretorias, en gránulos y en las membranas celulares. Las proteínas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup> son factores reguladores que residen en el citoplasma y que se activan en presencia de patógenos. Mientras que Rac2 es una GTPasa que facilita la activación del complejo. Para que se lleve a cabo la activación de NADPH, es necesario que Rac2 promueva la translocación del complejo regulatorio desde el citosol hacia la membrana, para interactuar con Cytb<sub>558</sub>. Una vez ensamblado el complejo, Rac2 permanece unida a la estructura catalítica

a través de gp91<sup>phox</sup> y a la estructura regulatoria a través de p67<sup>phox</sup>, promoviendo así la producción de ROS (**Figura 5**) (Giang T. Nguyen *et al.*, 2017).



**Figura 4. Metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS).** El complejo NADPH oxidasa cataliza la transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular ( $O_2$ ), generando aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) como producto principal. La enzima superóxido dismutasa (SOD) dismuta el  $O_2^{\cdot-}$  a especies no radicales de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Mientras que la mieloperoxidasa (MPO), localizada en gránulos, puede convertir el  $H_2O_2$  en ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) y el  $O_2^{\cdot-}$  en oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Adicionalmente, el hierro férrico puede transformar el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  en el radical hidroxilo. Todas las ROS generadas contribuyen a la eliminación de patógenos. Para limitar el daño al huésped, la SOD, la catalasa y el glutatión peroxidasa pueden convertir el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . Modificada de Nguyen *et al* 2017.



**Figura 5. Componentes de la oxidasa NADPH.** En estado inactivo, la estructura catalítica  $\text{cytb}_{558}$  del complejo NADPH, reside en las membranas celulares o de los fagosomas, mientras que las subunidades regulatorias  $\text{p47}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p67}^{\text{phox}}$  y  $\text{p40}^{\text{phox}}$ , así como la GTPasa Rac2, residen en el citosol. En estado de preactivación, la fosforilación parcial de  $\text{p47}^{\text{phox}}$  conduce a cambios conformacionales de su estructura. El estado activo se lleva a cabo cuando todas las subunidades regulatorias y Rac2 se translocan a la membrana de la fagolisosoma o a la membrana celular para interactuar con  $\text{cytb}_{558}$ , promoviendo así la producción de ROS de forma intracelular y extracelular, respectivamente. Modificada de Nguyen et al 2017 (Giang T. Nguyen *et al.*, 2017)

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Respuesta antiviral de los eosinófilos

Pese a que los EOs se han conservado por millones de años de evolución en la sangre y en los tejidos conectivos de todos los vertebrados evaluados (Megías *et al.*, 2023), pocos estudios en humanos han documentado la función benéfica de estas células durante infecciones virales. En contraste, el dogma actual sostiene que en humanos los EOs tienen funciones adversas en los pulmones inflamados, especialmente de personas asmáticas, promoviendo la hiperreactividad de las vías respiratorias. Aunque los EOs también promueven funciones de remodelación del tejido conectivo inflamado (Stevens *et al.*, 2007).

Investigaciones *in vivo* han destacado la implicación de los EOs en la respuesta inmunológica innata y adaptativa durante la infección viral. En un estudio con ratones hipereosinofílicos (transgénicos en IL-5) se demostró que para promover la eliminación del virus respiratorio sincitial, RSV (por sus siglas en inglés, Respiratory Sincitial Virus) los EOs liberan el contenido de sus gránulos e incrementan la expresión de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) a través de la activación de la vía del receptor tipo Toll 7 (TLR-7), la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y el factor regulador de interferón 7 (IRF7) (Phipps *et al.*, 2007). Además, estudios *in vitro* sugieren que los EOs utilizan proteínas de sus gránulos con actividad de ribonucleasa tales como ECP y ECN, como mecanismo antiviral. Por otro lado, Samarasinghe *et al.* (2017) establecieron un rol importante de los EOs en la respuesta antiviral adaptativa, promoviendo el reclutamiento de células TCD8<sup>+</sup> en ratones infectados con el virus de la Influenza tipo A (Amali E. Samarasinghe *et al.*, 2017).

#### 3.2 Comportamiento de los eosinófilos durante la infección por SARS-CoV-2

La eosinopenia, es decir, un recuento de EOs en sangre periférica por debajo de los valores normales para un individuo sano, fue observada como una anomalía de predicción para un mal pronóstico en pacientes COVID-19 por varios grupos de trabajo (Du *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020; Tanni *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). De forma opuesta, se observó que en pacientes COVID-19 hubo una correlación positiva entre el incremento en el recuento de EOs y la recuperación. Se sugirió que esto se debió a la probable contribución de los EOs en el control de la inflamación exacerbada inducida por los neutrófilos (Cortés-Vieyra *et al.*, 2021). Aunque futuros estudios deben corroborar esta hipótesis.

Recientemente, se asoció el reclutamiento de EOs en tejidos pulmonares de ratones en respuesta a la infección por SARS-CoV-2 con la reducción de títulos virales (Snow-Smith *et al.*, 2023). También, en los pulmones de ratones inmunizados con la subunidad S de la cepa ancestral de SARS-CoV-2 e infectados con la variante Beta de SARS-CoV-2, hubo una reducción de la carga viral en comparación con los ratones no inmunizados previo a la infección. La reducción de la carga viral se debió a la infiltración en los pulmones de macrófagos M2 que promovieron el reclutamiento de EOs a través de la liberación de eotaxina. De manera importante, los EOs reclutados en los ratones vacunados, mostraron un fenotipo diferente al de los EOs de los ratones no vacunados, al ser EOs con una alta capacidad fagocítica y con un alto contenido de gránulos (Moore *et al.*, 2024). Así mismo, en el suero de pacientes COVID-19 durante el curso de la enfermedad, se observó el incremento de proteínas de los gránulos de EOs, mientras que los recuentos de EOs estuvieron disminuidos, sugiriendo la respuesta antiviral de los EOs contra SARS-CoV-2 y su muerte durante el proceso (Snow-Smith *et al.*, 2023); sin embargo, los mecanismos específicos de estas células en la inmunidad contra SARS-CoV-2 no ha sido definida con claridad. Por lo que nuevos estudios deben establecer la función de los EOs durante la infección por SARS-CoV-2 en humanos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Se ha reportado que la eosinopenia en humanos es un mal pronóstico para que ocurra el desarrollo de COVID-19 grave. Mientras que algunos estudios en ratones infectados con SARS-CoV-2, han mostrado la asociación entre la infiltración de EOs en los pulmones y la reducción de la carga viral. Sin embargo, los mecanismos exactos de cómo los EOs responden ante la infección por el virus SARS-CoV-2 y cómo son afectados durante el proceso, aún no se han definido. Por lo tanto, el estudio del comportamiento de los EOs de humanos en la interacción con SARS-CoV-2 es un área de exploración importante. Por otro lado, al ser COVID-19 la enfermedad infecciosa más estudiada hasta el momento de acuerdo al “nature index”, se ofrece la posibilidad de aportar conocimiento para tener un panorama más completo del desarrollo de la infección viral, que pueda ser aplicado en la comprensión de la COVID-19 y de otras enfermedades provocadas por agentes infecciosos de naturaleza semejante.

#### **5. HIPÓTESIS**

Los eosinófilos de humanos establecen inmunidad antiviral contra el virus SARS-CoV-2 a través de mecanismos dependientes de la activación de TLR-7.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los eosinófilos de humanos contribuyen a la eliminación del virus SARS-CoV-2 mediante la activación de TLR-7, la respuesta de estallido respiratorio y la producción de interferón  $\beta$ .

#### **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar un método de purificación de eosinófilos de sangre periférica de humanos y caracterizar la pureza de las muestras de a través de la medición de la expresión de los marcadores de superficie CD45 y siglec-8.
2. Determinar la expresión de TLR-7 en eosinófilos estimulados con el virus SARS-CoV-2.
3. Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno en eosinófilos estimulados con el virus SARS-CoV-2.
4. Cuantificar la expresión de IFN- $\beta$  en eosinófilos estimulados con el virus SARS-CoV-2.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

*Extracción de sangre venosa.* La sangre fue recolectada de voluntarios sanos mayores de edad por venopunción. Todos los experimentos se realizaron bajo la aprobación del comité de bioética de la UMSNH. Número de oficio: CEIIB-UMSNH/164-2025.

*Purificación de PMN.* Se siguieron las instrucciones descritas a continuación, de una versión modifica del protocolo de García-García, *et al.* (2013) para la extracción de PMN (García-García *et al.*, 2013) (**Figura 6**). En condiciones estériles, se colocó en un tubo de 15 ml, 0.25 ml de heparina (1000 U/ml) y 2 ml PBS con Dextran T500 al 6% a temperatura ambiente (TA). En otro tubo de 15 ml, se adicionaron 5 ml de Ficoll® Paque a TA. Se adicionaron 10 ml de sangre fresca al tubo con heparina y dextran, la cual fue mezclada por inversión dos o tres veces y se dejó reposar durante 45 min. El plasma se transfirió a el tubo con Ficoll® Paque formando una segunda capa; después se centrifugó a 2160 rpm durante 20 min a 4°C. Después de aspirar el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 3 ml de PBS mantenido en hielo. La suspensión celular fue distribuida en 6 tubos eppendorf (500 µl en cada tubo) conteniendo 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos (Roche®). Se colocaron los tubos en hielo por 10 min y se invirtieron periódicamente para después ser centrifugados a 500 x g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta estéril y la pastilla fue resuspendida en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 frío y se mantuvo en hielo. Se realizó un conteo, y la suspensión celular se llevó a 10<sup>7</sup> células/ml.

*Purificación de EOs por técnica inmunomagnética.* Se llevó a cabo con el kit comercial MACS® separation (Miltenyi Biotec). Después de la preparación de los reactivos, se tomó una alícuota de una mezcla de polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos) aislados previamente con Ficoll® Paque, y se colocó en un tubo de 15 ml. Se cerró el tubo y se invirtió suavemente tres veces. Se incubó la muestra durante 5 min a TA, utilizando un rotador de tubos a 12 rpm. En seguida se procedió a la separación magnética. Para ello se removió el tubo de la muestra del rotador y se abrió cuidadosamente. Se colocó el tubo en el campo magnético del separador por 15 min. Las células etiquetadas magnéticamente (células no deseadas) fueron adheridas a la pared del tubo. Mientras el tubo se encontraba dentro del separador, se recuperó cuidadosamente el sobrenadante en un tubo nuevo de 50 ml. El sobrenadante contenía la fracción de EOs. Se tomó una alícuota del sobrenadante para el conteo de células (**Figura 7**).

*Evaluación de la pureza de los EOs.* La pureza y recuperación de los eosinófilos enriquecidos se evaluó mediante citometría de flujo. Una alícuota de cada fracción de muestra recogida durante la separación magnética, fue teñida con anticuerpos anti-siglec-8 (PerCP/Cyanine 5.5-BL3) y anti-CD45 (PE-YL1).

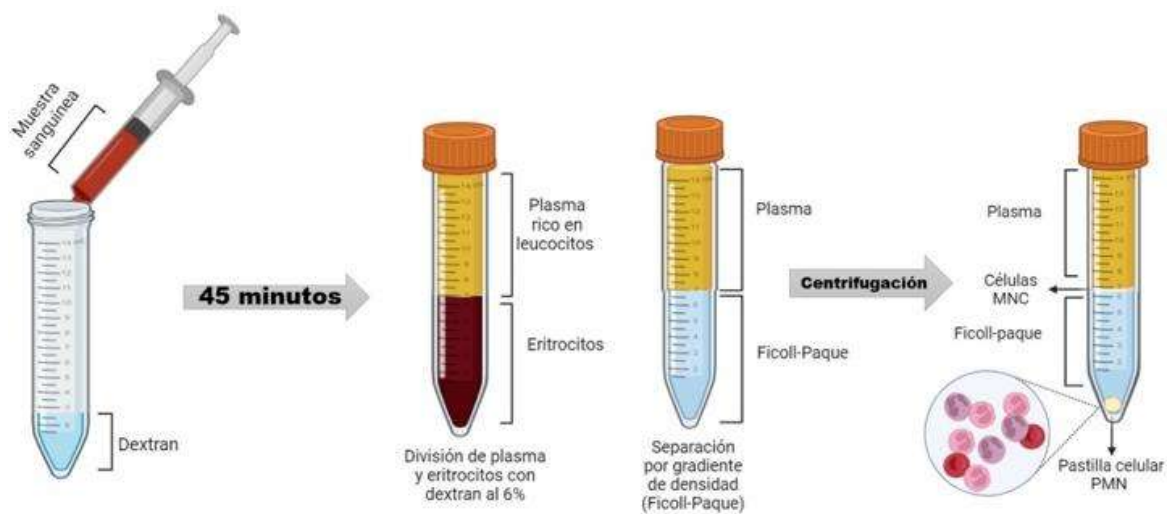
*Características de las partículas virales de SARS-CoV-2.* Se usaron partículas de SARS-CoV-2 inactivadas por calor (SARS-CoV-2-I) de AcroMetrix<sup>TM</sup>, número de catálogo: 954517.

*Análisis de la expresión de TLR-7 en EOs por citometría de flujo.* Para determinar la expresión de la proteína intracelular TLR-7 en EOs previamente estimulados con SARS-CoV-2-I durante 20 h, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 5 min, luego se incubaron con saponina al 0.1% en PBS durante 20 min, seguido de la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-TLR7 con reactividad humana (Brilliant Violet 421<sup>TM</sup> de Biolegend® con número de catálogo: 376909). Finalmente se llevó a cabo la detección del receptor por citometría de flujo. (Phipps *et al.*, 2007).

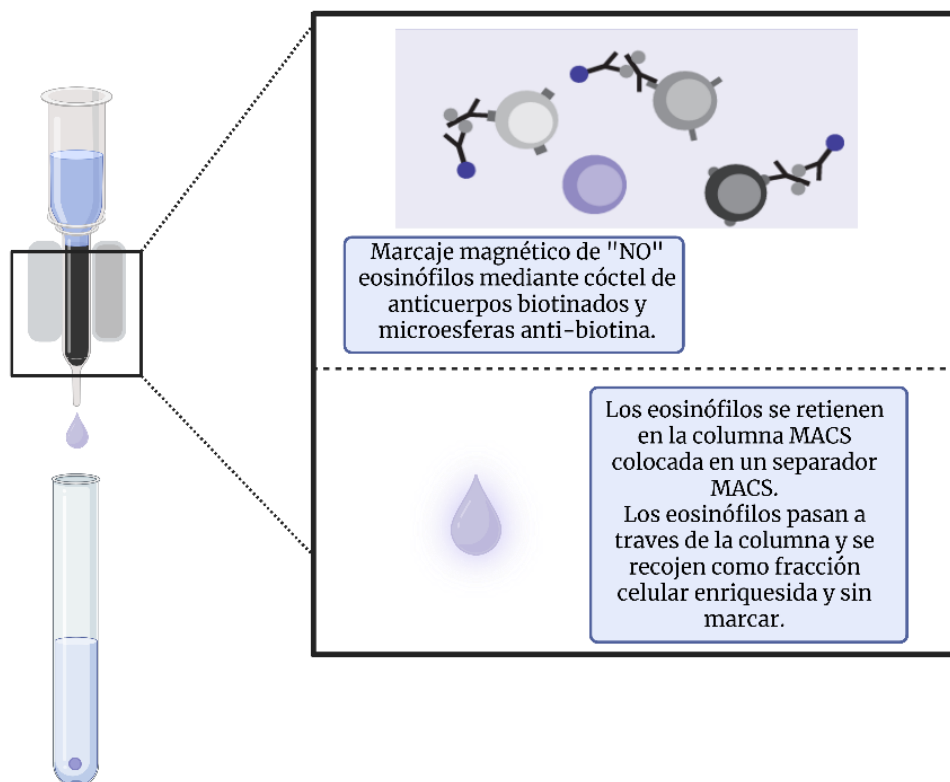
*Cuantificación de IFN- $\beta$ .* Posterior a la estimulación de EOs con SARS-CoV-2-I e incubación durante 20 h a 37°C, se llevó a cabo la extracción de RNA con TRIzol® y se cuantificó la expresión del gen que codifica para el IFN- $\beta$  por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) con el kit SCRIPT Reverse Transcriptase de Jena Bioscience® que incluye el colorante SYBR Green I.

*Cuantificación de estallido respiratorio dependiente de NADP-oxidasa.* Se utilizó el kit Neutrophil/Monocyte Respiratory Burst Assay de Cayman Chemical®. Se adicionó dihidrodamina 123 (DHR123) a las muestras de EOs y se incubaron a 37°C por 15 min. Se adicionó *forbol 12-miristato 13-acetato* (PMA), PBS o los EOs fueron estimulados con SARS-CoV-2-I e incubados a 37 °C por 45 min. Se adicionó un buffer de lisis y se incubó el cultivo a 37 °C de 20-30 min. Se centrifugaron las células e inmediatamente después de ser resuspendidas, se realizó la determinación de estallido respiratorio por citometría de flujo.

*Análisis estadístico.* Para la obtención de los valores de *P*, se compararon los grupos experimentales utilizando la prueba ANOVA de una vía con post-hoc Holm-Šidák's.



**Figura 6. Purificación de células polimorfonucleares (PMN) con Dextrano y Ficoll® Paque.**

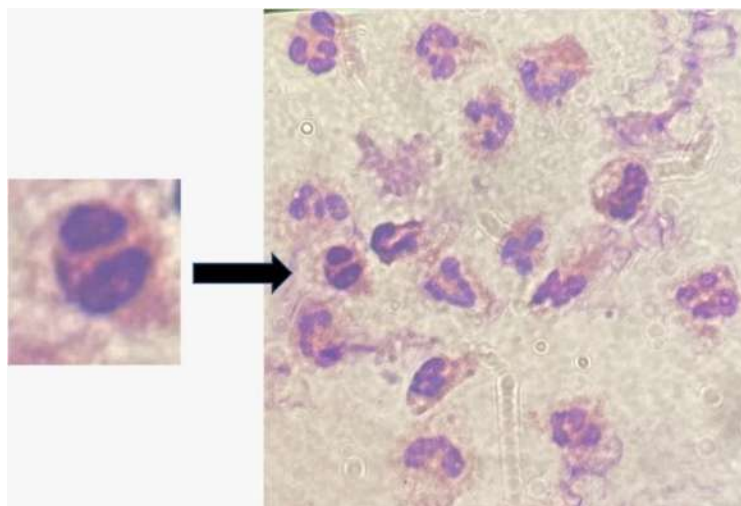


**Figura 7. Purificación de eosinófilos por técnica inmunomagnética MACS®.** Los EOs fueron purificados partiendo de una mezcla de células polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos).

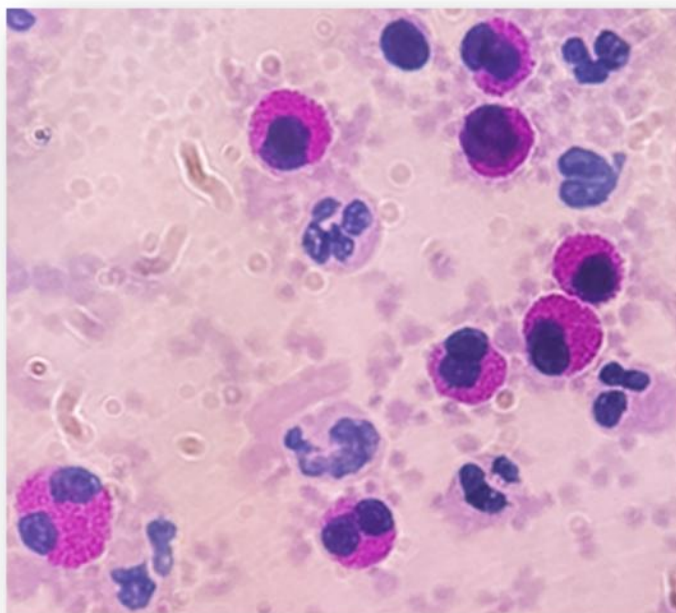
## 9. RESULTADOS

### 9.1 Estandarización de la purificación de eosinófilos

Primero se realizó la purificación de una mezcla de PMN que incluye neutrófilos y EOs a partir de sangre periférica. Esto con el objetivo de probar si se obtendría un mayor rendimiento de EOs partiendo de sangre completa o de la mezcla de PMN. Para ello se trabajó con una versión modifica del protocolo de García-García *et al.* (2013) para la extracción de PMN (**Figura 6**). En tres repeticiones se obtuvo un promedio de  $18 \times 10^6$  células por cada 10 ml de sangre, con una viabilidad del 99%, de acuerdo a la tinción con azul de tripano (Datos no mostrados). También se verificó la purificación tiñendo las células con eosina y observándolas en el microscopio. Se observaron células con la morfología de neutrófilos (núcleo multilobulado) y células con la morfología particular de EOs, núcleo bilobulado teñido de color morado y citoplasma con gránulos de color naranja (**Figura 7**). Una vez estandarizada la purificación de PMN, se aislaron los EOs por técnica inmunomagnética. Esta metodología permitió una selección negativa de los EOs, preservando la integridad celular y evitando su activación por señalización de receptores o unión directa de anticuerpos. Posterior a la separación, se evaluó la morfología de las células aisladas mediante la tinción con hematoxilina y eosina, observando una población homogénea de EOs, con núcleos bilobulados y gránulos citoplasmáticos (**Figura 9**).



**Figura 8. Tinción Wright de células polimorfonucleares.** Se indica con una flecha los eosinófilos teñidos de rojo en el citoplasma y con la morfología típica del núcleo bilobulado. También se observan neutrófilos (células multilobuladas). Objetivo 100x.

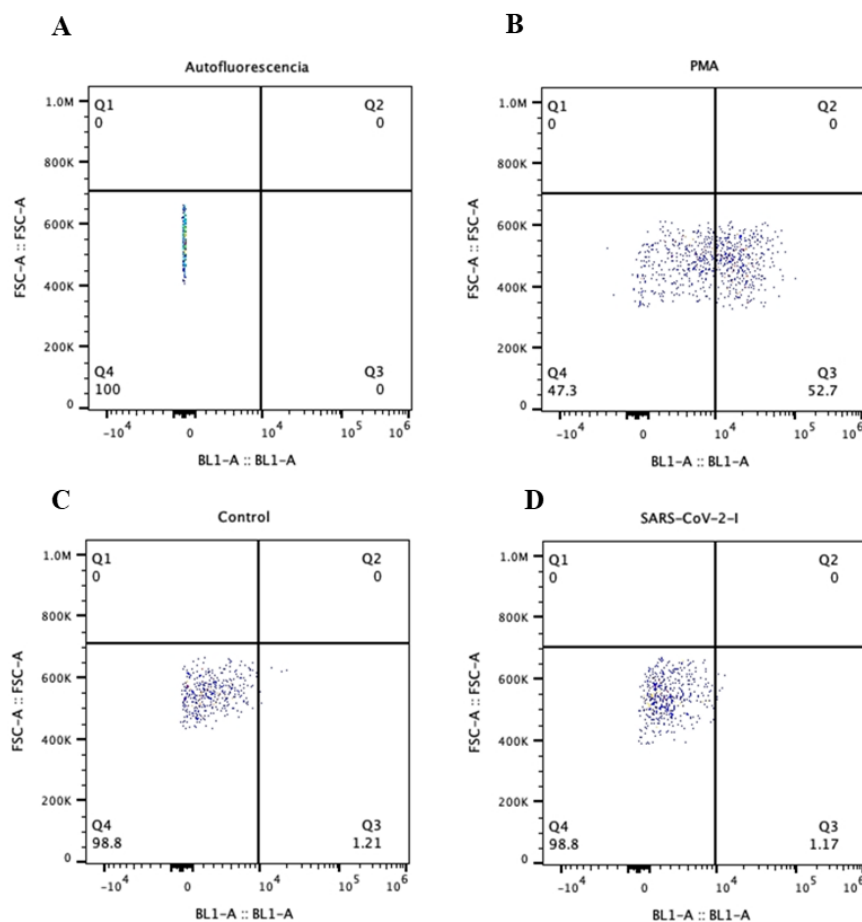


**Figura 9. Tinción de eosinófilos aislados por técnica inmunomagnética con hematoxilina y eosina.** Se aprecia la integridad de los eosinófilos (células redondas sin liberación de gránulos). Objetivo 100X.

## **9.2 Determinación de estallido respiratorio en células polimorfonucleares por el estímulo viral (número de partículas de SARS-CoV-2-I)**

Las ROS son esenciales para la defensa inmunitaria innata de células PMN contra infecciones bacterianas, fúngicas y virales (Giang T. Nguyen et al., 2017). Con el objetivo de establecer la concentración y tiempo óptimos de estimulación con SARS-CoV-2-I (SARS-CoV-2 inactivado), se estimularon las células PMN con el virus y se cuantificó el nivel de estallido respiratorio. Se estimularon  $1 \times 10^6$  PMN con  $375 \times 10^3$  partículas virales por 45 min y se determinó el estallido respiratorio por citometría de flujo. Se observó que en el control positivo (células estimuladas con PMA, forbol-12-miristato-13-acetato), aproximadamente el 50% de los PMN realizaron estallido respiratorio. Sin embargo, los PMN estimulados con SARS-CoV-2-I mostraron un nivel de fluorescencia igual al del control negativo (células sin estímulo, teñidas con dihidrorodamina 123) (**Figura 10**). Tomando en cuenta que en un trabajo de Lebourgeois *et al.* (2022), la estimulación de PMN con partículas infecciosas de SARS-CoV-2 no produjo especies reactivas de oxígeno a multiplicidades de infección (MOI) bajas (0.1, 1 y 10), pero si a MOI altas (100 y 500) (Lebourgeois *et al.*, 2022), es probable que no se observó

la respuesta de estallido respiratorio en PMN estimulados con SARS-CoV-2-I, debido a que se estimularon las células con pocas partículas virales. Por lo que para estimular los EOs se incrementó el número de partículas virales de SARS-CoV-2-I de  $375 \times 10^3$  partículas virales por  $1 \times 10^6$  células a  $1.4 \times 10^6$  partículas virales por  $1 \times 10^6$  de células.

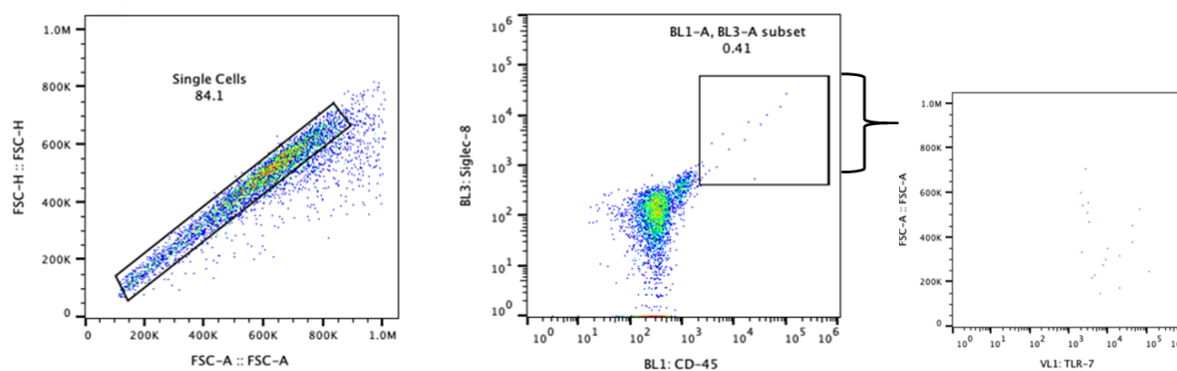


**Figura 10. Cuantificación de estallido respiratorio en PMN de humano.** Gráficas de puntos (dot blots) mostrando en los paneles: **A** autofluorescencia de las células sin teñir con dihidrorodamina 123 (DHR123), en **B** fluorescencia emitida por la tinción con DHR123 y el estímulo con PMA, en **C** control negativo en las células teñidas con DHR123, pero sin estímulo y en **D** fluorescencia de células teñidas y estimuladas con SARS-CoV-2. Señalando, en el eje Y, FSC-A (por Forward Scatter Area), es decir, la intensidad de la luz en dispersión frontal, la cual se relaciona con el tamaño de la célula y en el eje X (BL1-A) el cual es un canal para la detección de fluorescencia a 530/30 nm. Se cuantificaron un total de 10 000 eventos. Las gráficas son representativas de 4 repeticiones por duplicado.

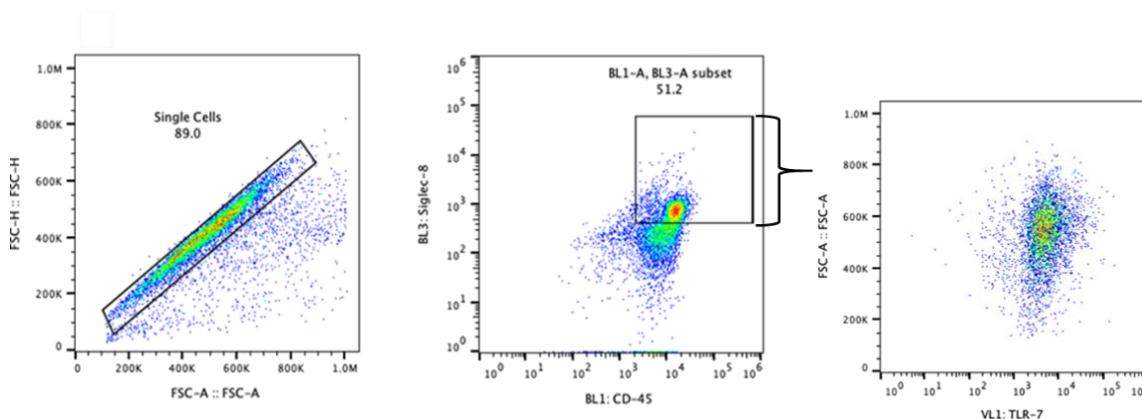
### 9.3 Determinación de la expresión del receptor TLR-7 en eosinófilos estimulados con SARS-CoV-2

Con la finalidad de evaluar si el estímulo de EOs con el virus SARS-CoV-2 induce un incremento en la expresión del receptor tipo toll 7 (TLR-7) (Lee *et al.*, 2009), se cuantificó al receptor por citometría de flujo, empleando un anticuerpo fluorescente específico contra TLR-7. Previo a la cuantificación, los EOs fueron estimulados durante 20 h con SARS-CoV-2-I y se realizó la caracterización inmunofenotípica de las células por medio de citometría de flujo, utilizando anticuerpos dirigidos contra CD45 y Siglec-8, marcadores específicos para leucocitos y EOs maduros, respectivamente. Los resultados mostraron en las poblaciones CD45<sup>+</sup>/Siglec-8<sup>+</sup> (**Figura 11B**), un aumento en la fluorescencia en el canal de detección de TLR-7, en EOs estimulados con TNF- $\alpha$  (control positivo) y en EOs estimulados con SARS-CoV-2-I, en comparación con las células no estimuladas y estimuladas con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV), utilizado como control negativo (**Figura 12**). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (**Figura 13**), sugiriendo una inducción de la expresión de TLR-7 en EOs como parte de la activación inmunológica frente al SARS-CoV-2.

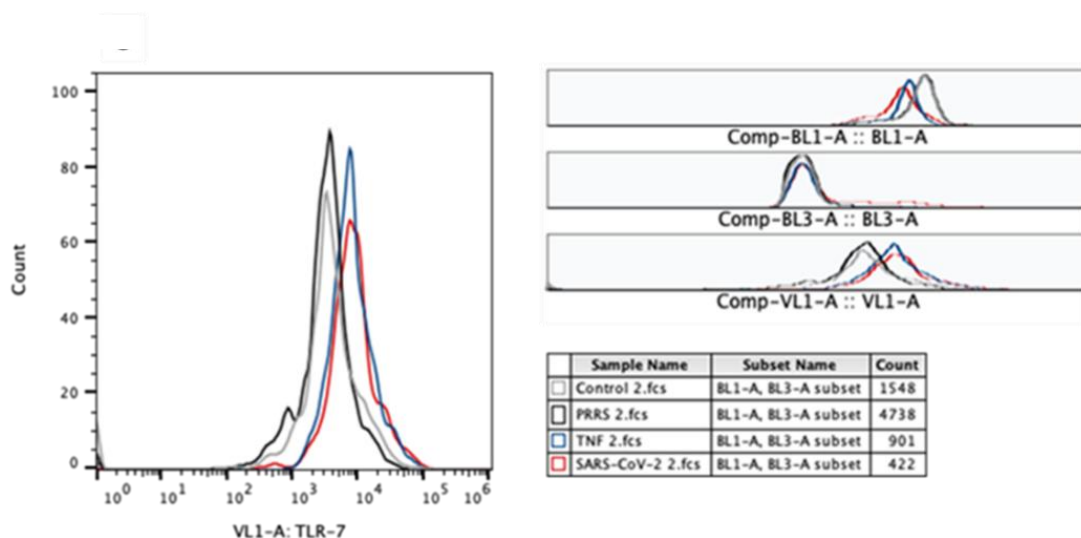
#### Panel A



## Panel B

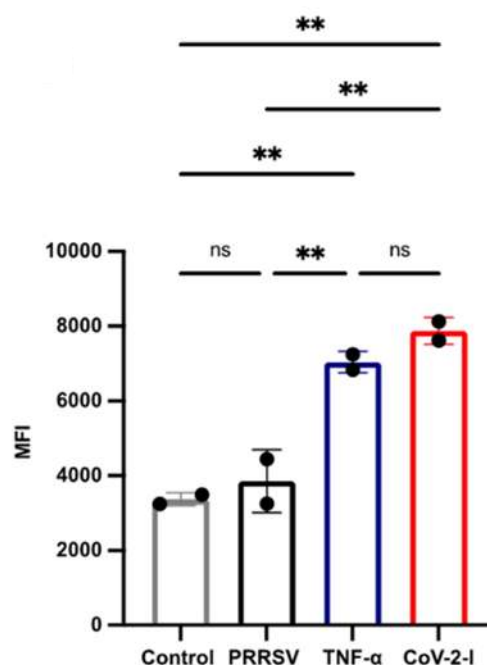


**Figura 11. Análisis por citometría de flujo para la evaluación de la expresión del receptor TLR-7 en eosinófilos humanos estimulados con SARS-CoV-2.** Se muestra el análisis de la expresión de TLR-7 en EOs estimulados, e incubados durante 20 h con el virus SARS-CoV-2 inactivado. **Panel A**, ruta de análisis en donde partimos de células individuales (FSC-H Vs. FSC-A) para analizar la población dentro de la diagonal, de células emitiendo autofluorescencia. **Panel B**, porcentaje de células positivas. Se determinó con base en el desplazamiento de la población hacia el cuadrante superior derecho, correspondiente al incremento de fluorescencia por la unión del anticuerpo anti-TLR-7 al receptor.



**Figura 12. Determinación de la expresión de TLR-7 en eosinófilos humanos estimulados con SARS-CoV-2.** Se muestra la comparación de histogramas de fluorescencia en EOs no estimulados (gris), estimulados con el control negativo, PRRSV (negro), con el control positivo, TNF- $\alpha$  (azul) y estimulados con SARS-CoV-2 (rojo).

En el canal BL-1 se determinó la expresión del marcador CD45 (específico de leucocitos), en el canal BL3 se determinó la expresión de la proteína Siglec-8 (específica de EOs) y en el canal VL-1 se determinó la expresión de TLR-7. El desplazamiento de histogramas a la derecha, indica una mayor fluorescencia.



**Figura 13. Cuantificación de la expresión del receptor TLR-7 en eosinófilos humanos estimulados con SARS-CoV-2.** Los eosinófilos fueron incubados durante 20 h bajo distintas condiciones: sin estímulo (control), estimulados con el virus PRRS (control negativo), con TNF- $\alpha$  o con SARS-CoV-2. La expresión de TLR-7 es representada como intensidad media de fluorescencia (MFI). n=2; \*\* $P \leq 0.0085$ .

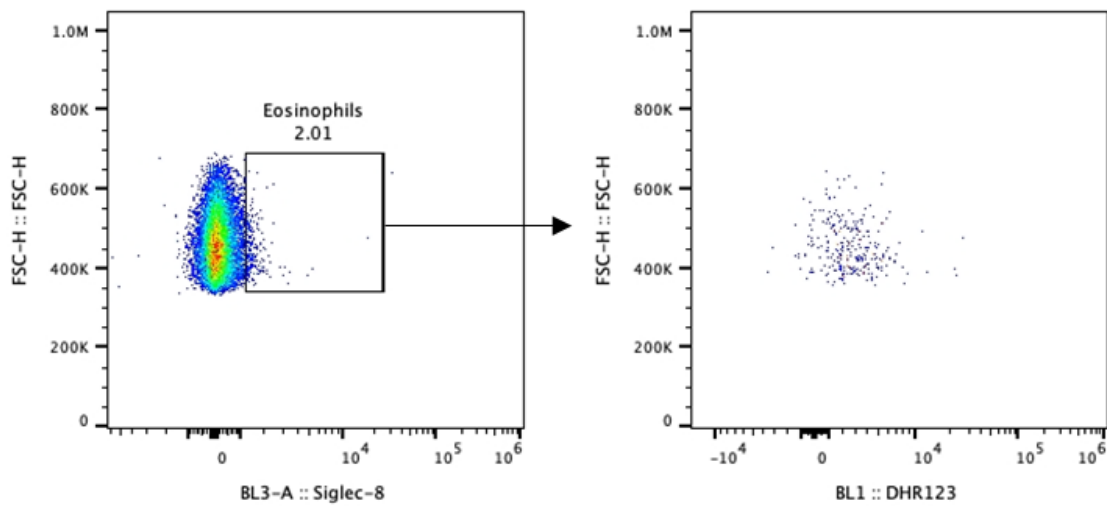
#### 9.4 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno en eosinófilos estimulados con SARS-CoV-2

Antes de evaluar si los EOs tienen la capacidad para generar ROS en respuesta a la estimulación con SARS-CoV-2, se realizó la caracterización inmunofenotípica de las células. El análisis mostró una proporción alta de células CD45<sup>+</sup>/Siglec-8<sup>+</sup> de entre el 70% al 90% (**Figura 14**). Debido a que el resto de células CD45<sup>+</sup>/Siglec-8<sup>-</sup> tienen una complejidad y tamaño similar a la población de EOs, es probable que estas células sean neutrófilos.

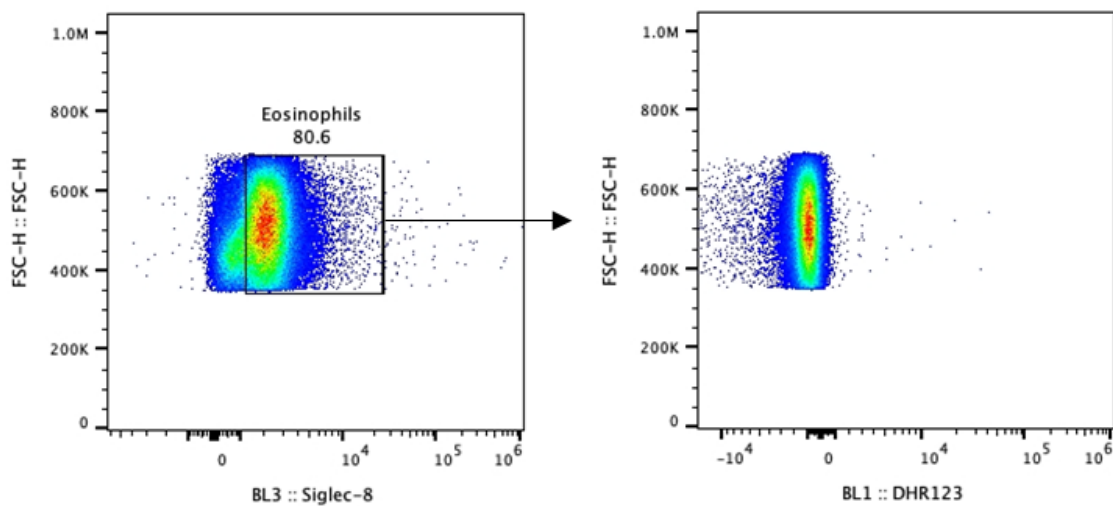
Debido a que no se observó estallido respiratorio en PMN estimulados con una baja proporción de partículas virales ( $375 \times 10^3$  partículas virales/ $1 \times 10^6$  PMN) a un tiempo de 45 min, para

estimular a los EOs además de incrementar el número de partículas virales de SARS-CoV-2, se incrementó el tiempo de incubación a 2 h. Los resultados mostraron un incremento significativo en la señal fluorescente en la población de EOs estimulados con PMA (control positivo) y con SARS-CoV-2, en comparación con los controles negativos, sin estímulo y estimulados con *PRRSV*, evidenciando un aumento en la producción de ROS (**Figura 15-16**). Estos hallazgos sugieren que los eosinófilos responden a la eliminación del SARS-CoV-2 activando su maquinaria oxidativa.

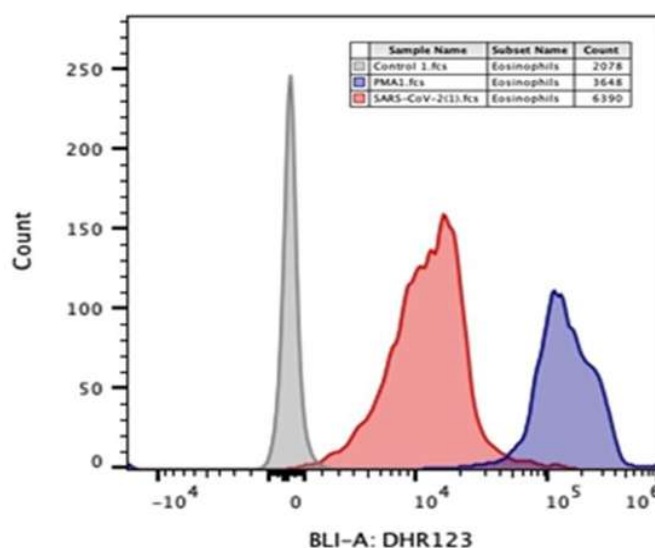
### Panel A



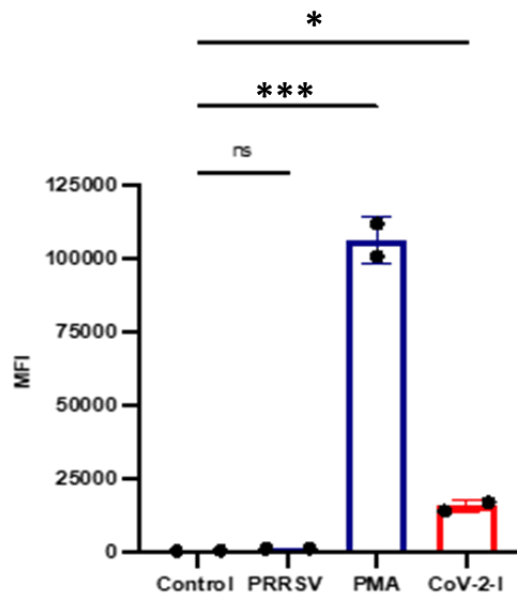
### Panel B



**Figura 14. Inmunofenotipificación de eosinófilos humanos usados para la determinación de estallido respiratorio.** Los dot blots muestran la estrategia de análisis por citometría de flujo. En **A** se evaluó una muestra sin teñir, utilizada para establecer el umbral basal de fluorescencia. En **B** se observa una muestra teñida con anticuerpos anti-CD45 y anti-siglec-8, se observa que el 67.7% de las células son doble positivas, esta población de eosinófilos fue tomada para la detección de ROS.



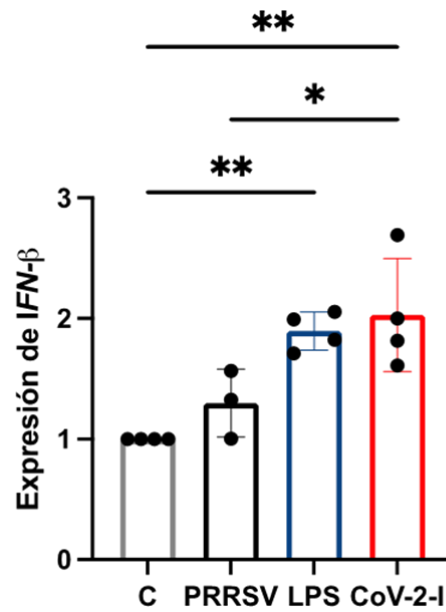
**Figura 15. Determinación de estallido respiratorio en eosinófilos humanos estimulados con SARS-CoV-2.** Nivel de fluorescencia en eosinofilos preteñidos con DHR1234 en tres condiciones: control sin estímulo (gris), estimulados con PMA, control positivo (azul) y estimulados con SARS-CoV-2 (rojo). El desplazamiento hacia la derecha del pico de fluorescencia, indica un aumento en la oxidación de DHR123, reflejando una mayor producción de especies reactivas de oxígeno. DHR: dihidrodamina 123. PMA: *forbol 12-miristato 13-acetato*.



**Figura 16. Cuantificación del nivel de estallido respiratorio en eosinófilos humanos estimulados con SARS-CoV-2.** La gráfica muestra el análisis de la señal de fluorescencia emitida por DHR123 en eosinófilos incubados bajo cuatro condiciones experimentales: sin estímulo, PRRSV (control negativo) PMA (control positivo) y con SARS-CoV-2-I. MFI (intensidad media de fluorescencia). n=6; \* $P=0.0482$ , \*\* $P=0.0004$ .

### 9.5 Cuantificación de la expresión del gen *IFN- $\beta$* en eosinófilos estimulados con el virus SARS-CoV-2.

El análisis de la determinación del nivel de expresión del gen que codifica para *IFN- $\beta$*  mostró que la estimulación de EOs de humano con el virus *PRRSV*, indujo un aumento de la expresión relativa de este mensajero, comparando con el grupo control; sin embargo, el incremento no fue estadísticamente significativo. Mientras que los EOs estimulados con LPS o con SARS-CoV-2, mostraron un incremento estadísticamente significativo respecto al control sin estímulo y respecto al control negativo, en el caso de los EOs estimulados con SARS-CoV-2 (**Figura 17**). Estos datos indican que los EOs de humano responden a la infección por SARS-CoV-2 a través de respuestas dependientes de la activación del receptor TLR-7, tales como la expresión de la citocina con funciones antivirales, *IFN- $\beta$* .



**Figura 17. Expresión relativa del ARNm del gen de *IFN-β* en eosinófilos humanos estimulados con SARS-CoV-2.** Los eosinófilos fueron incubados durante 20 h bajo tres condiciones: células no estimuladas (C), estimuladas con el virus PRRSV, estimuladas con LPS o estimuladas con SARS-CoV-2. La cuantificación de ARNm se realizó mediante RT-qPCR con el método  $C_t$  comparativo, utilizando como control endógeno, la determinación de la expresión del gen que codifica para la *gliceraldehído-3-fosfato*.  $n=4$ ;  $*P=0.0252$ ,  $**P\leq 0.0049$ .

## 10. DISCUSIÓN

Tradicionalmente, los EOs han sido considerados células efectoras asociadas principalmente a procesos patológicos, en particular, a enfermedades alérgicas y asma. También se ha establecido su función proinflamatoria en el contexto de infecciones parasitarias. Esta visión vincula a los EOs de manera consistente, con funciones contraproducentes para el hospedero, debido al daño tisular derivado de la liberación del contenido de sus gránulos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha replanteado este paradigma y múltiples estudios han demostrado que los EOs poseen una notable plasticidad funcional, participando en mecanismos de reparación tisular, regulación inmunológica y en la respuesta antiviral (Kanda *et al.*, 2021).

En el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2, la identificación de factores clínicos y celulares que modulan la severidad de la enfermedad han sido una prioridad. Entre ellos, el estudio del comportamiento del sistema inmunitario en pacientes con asma ha despertado particular interés, ya que este grupo presenta alteraciones inmunológicas crónicas, la presencia de EOs en niveles muy altos y un perfil de citocinas tipo 2 (Interleucinas 4, 5 y 13), por lo que al principio de la pandemia COVID-19 se consideró a estos pacientes más susceptibles a la enfermedad grave. Sin embargo, diversos estudios clínicos mostraron que la presencia de asma no se asocia con la enfermedad grave ni con peores desenlaces. Por ejemplo, una revisión sistemática, concluyó que la prevalencia de asma entre los pacientes positivos a la infección por SARS-CoV-2 fue de tan solo el 7.46% y que los asmáticos presentaron incluso una reducción del 14% en el riesgo de infección, comparado con la población general (Quinn *et al.*, 2025; Sunjaya *et al.*, 2022). Más aún, varios estudios han sugerido que los pacientes con fenotipo asmático eosinofílico, tienen menores probabilidades de hospitalización por COVID-19 grave o presentan una evolución clínica más favorable (menor necesidad de ventilación mecánica o ingreso en unidad de cuidados intensivos), lo que ha conducido a la hipótesis de que los EOs podrían desempeñar un papel protector (Ferastraoaru *et al.*, 2021; Maurizio Gabrielli 1 2023; Quinn *et al.*, 2025) (Gabrielli *et al.*, 2023).

Respecto a estudios *in vivo* sobre la función protectora que ofrecen los EOs durante la infección viral, un estudio reciente mostró que tras la infección de ratones con SARS-CoV-2, posterior a la inmunización con la proteína S del mismo virus, hubo una reducción significativa del título viral en los pulmones de los ratones por efecto del incremento de EOs (Moore *et al.*, 2024). Este hallazgo aportó evidencia sólida de que los EOs, tradicionalmente vinculados a procesos

patológicos, también participan en la defensa contra *coronavirus*. Sin embargo, el estudio dejó interrogantes sobre los mecanismos efectores para la eliminación del virus. En este trabajo, demostramos que los EOs de humano son capaces de montar respuestas antivirales específicas contra SARS-CoV-2, a través de la probable activación del receptor TLR-7, la respuesta de estallido respiratorio y la expresión de IFN- $\beta$ , contribuyendo así en la comprensión sobre los mecanismos efectores de los EOs para la eliminación de virus de COVID-19.

El RNA monocatenario (ssRNA) viral con una alta proporción de motivos GU/UU, es capaz de estimular los receptores TLR 7 y 8, promoviendo así una respuesta proinflamatoria intensa en la célula hospedera (Ghimire *et al.*, 2025). Recientemente se ha demostrado que los EOs de humano expresan TLR7, además de una amplia gama de receptores de superficie, lo que les confiere una notable plasticidad funcional modulada por el microambiente inmunológico y el contexto celular (Kanda *et al.*, 2021; Phipps *et al.*, 2007). Así mismo, el receptor TLR7 ha sido directamente asociado con la inducción de respuestas antivirales mediadas por interferones tipo I (Diebold *et al.*, 2004; Ghimire *et al.*, 2025). En este sentido, resultó relevante observar el incremento en la expresión de TLR-7 en EOs estimulados con SARS-CoV-2. Los datos mostraron un incremento altamente significativo en la expresión de TLR-7, tras la estimulación con el virus, lo que sugiere que, la probable activación del receptor condujo al incremento de su expresión, tal como se ha reportado para otros receptores TLR (Ghimire *et al.*, 2025). Este hallazgo es consistente con lo reportado por Phipps *et al.* (2007) (Phipps *et al.*, 2007), quienes demostraron que la activación de TLR-7 promueve respuestas antivirales frente al virus respiratorio sincitial (VRS) en modelos murinos. En contraste, EOs deficientes de MyD88, una proteína adaptadora esencial en la señalización mediada por TLR-7, presentaron una mayor replicación viral (Macchia *et al.*, 2023). En conjunto, estos datos refuerzan el hallazgo de que TLR-7 constituye un mecanismo indispensable para la respuesta antiviral de EOs de humano frente a la infección por SARS-CoV-2. Con respecto al proceso de infección, a pesar de que los EOs expresan niveles muy bajos o prácticamente nulos de ACE2, el principal receptor que permite la entrada de SARS-CoV-2 a las células humanas (Hoffmann *et al.*, 2020), suponemos que la internalización del virus podría ocurrir mediante fagocitosis, a través de la activación de otros receptores. No obstante, aún se necesitan estudios complementarios que validen esta información. El ingreso del virus independiente del mecanismo, implica la participación del receptor endosomal TLR-7.

El metabolismo oxidativo explosivo, también conocido como estallido respiratorio, es la producción rápida de especies reactivas de oxígeno mediante la activación del complejo NADPH oxidasa, constituyendo un mecanismo efector esencial en granulocitos tales como los neutrófilos (Mortimer *et al.*, 2021). Los EOs se ha estudiado ampliamente en pacientes con eosinofilia; sin embargo, investigaciones en individuos sanos han permitido comprender con más detalle su función como efectores de la inmunidad innata (Gaur *et al.*, 2022; Kanda *et al.*, 2021; Shamri *et al.*, 2011). A diferencia de los neutrófilos, reconocidos tradicionalmente por su potente capacidad de respuesta de estallido respiratorio, se ha descrito que los EOs contienen entre 1.5 y 3.3 veces más componentes proteicos del complejo NADPH oxidasa incluyendo,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  y  $p40^{phox}$ , lo que se traduce en una mayor producción del anión superóxido tras la activación del complejo (Someya *et al.*, 1997). En condiciones de estimulación con zimosán opsonizado, un polisacárido derivado de la pared celular de levaduras, recubierto con sueros opsonizantes, los EOs generaron entre 1.4 y 1.7 veces más ROS que los neutrófilos y presentaron un consumo de oxígeno más sostenido (Someya *et al.*, 1997). De manera adicional, bajo estímulos capaces de activar receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o tras la exposición a citocinas proinflamatorias, los EOs producen ROS de manera prolongada y predominante (Vorobjeva *et al.*, 2023). Asimismo, los EOs muestran un consumo basal de oxígeno elevado y una respuesta mantenida tras la estimulación, aunque el pico máximo de consumo es comparable al de los neutrófilos (Porter *et al.*, 2018).

Al respecto, nuestros resultados respaldan el potencial antiviral de los EOs frente a SARS-CoV-2 mediante la producción de ROS. En nuestro modelo se observó una respuesta moderada, pero estadísticamente significativa respecto a los controles negativos. Este hallazgo es consistente con lo descrito en modelos murinos, donde la activación del receptor intracelular TLR-7, durante la infección con los virus VRS o influenza A, activaron una cascada de señalización dependiente de MyD88, indispensable para la inducción de respuestas antivirales, que incluyen la respuesta de estallido respiratorio. En este sentido, la activación de TLR-7 en EOs, promueve la generación de ROS como parte de su arsenal efector, debido a que las ROS son moléculas capaces de dañar directamente las partículas virales (Echavarria *et al.*, 2023; Nagase *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran un hallazgo de gran relevancia, al ser el primer estudio en evidenciar que los EOs de humano, pueden participar en la respuesta antiviral contra SARS-CoV-2, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno.

Es importante destacar que la producción de especies reactivas fue menor en EOs estimulados con SARS-CoV-2 en comparación con el estímulo de PMA. Esto probablemente se debe a que el PMA induce la fosforilación de p22<sup>phox</sup>, proteína importante del núcleo catalítico del complejo enzimático NADPH oxidasa, encargado de la transferencia de electrones para la generación de ROS, a través de la vía de la proteína cinasa C (PKC), lo que favorece la interacción con p47<sup>phox</sup> (proteína perteneciente al núcleo catalítico del complejo enzimático NADPH oxidasa), indispensable para su función de transferencia de electrones y la activación del complejo NADPH oxidasa de manera directa, generando una respuesta de estallido respiratorio robusta (G. T. Nguyen *et al.*, 2017). En cambio, los ligandos TLR promueven un estado de preparación de la NADPH oxidasa, donde es más susceptible a la activación por un segundo estímulo (G. T. Nguyen *et al.*, 2017). Esto sugiere que la producción de ROS en EOs estimulados con SARS-CoV-2, se llevó a cabo a través de la activación del receptor TLR-7, siendo probablemente el RNA viral el primer estímulo y algún otro componente del virus el segundo estímulo.

Tras la activación del receptor TLR7, vías de señalizaciones específicas conducen a la activación de factores transcripcionales responsables de la expresión de interferones tipo I. La producción de estas citocinas, en particular de IFN- $\beta$ , representa un eje central de la respuesta antiviral innata, al actuar como una de las primeras barreras moleculares frente a la replicación viral. La activación de estos factores transcripcionales ocurre tras el reconocimiento de patrones por PRRs, tales como los receptores endosomales TLR7/8, el receptor citosólico RIG-I (Receptor tipo I inducible por ácido retinoico) y el receptor MDA5 (por sus siglas en inglés Melanoma Differentiation Associated gene 5). Los receptores activan proteínas adaptadoras tales como MyD88 (por sus siglas en inglés **M**yeloid **D**ifferentiation Primary Response gene **88**), TRIF (por sus siglas en inglés TIR domain-containing adptor protein inducing IFN- $\beta$ ) o MAVS (por sus siglas en inglés **M**itochondrial **A**ntiviral **S**ignaling Protein), que reclutan las quinasas TBK1 (**T**ANK-**B**inding **K**inase **1**) e IKK (**I**kB kinase), encargadas de la fosforilar a los factores IRF-3 (Por sus siglas en inglés **I**nterferon **R**egulatory **F**actor **3**) e IRF-7 (por sus siglas en inglés **I**nterferon **R**egulatory **F**actor **7**), promoviendo la transcripción de IFN- $\beta$  (Zhou *et al.*, 2020). En particular, IFN- $\beta$  secretado actúa de manera autocrina y paracrina sobre el receptor IFNAR, activando la vía JAK-STAT que conduce a la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs), responsables de establecer un estado antiviral en células vecinas (Babadei *et al.*, 2024).

Consistentemente, observamos que la estimulación de los EOs con el virus SARS-CoV-2, induce de manera significativa el incremento en la expresión del ARNm de *IFN-β*, sugiriendo la activación de vías de señalización que promueven respuestas antivirales. Estos resultados se alinean con estudios previos que muestran la respuesta de los EOs frente a diversos virus, mediante la producción de citocinas con actividad antiviral. Por ejemplo, la infección de ratones con el virus VRS, mostró que los EOs incrementaron la expresión de *IFN-β*, *IRF-7* y *NOS2* (óxido nítrico sintetasa inducible), promoviendo un perfil inmunomodulador y antiviral dependiente de TLR-7. Hallazgos similares se han reportado frente al neumovirus, un virus ARN monocatenario (JM, 2021; A. E. Samarasinghe *et al.*, 2017). En conjunto, estos datos respaldan la capacidad de los EOs para activar mecanismos efectores mediados por interferones tipo I, contribuyendo el establecimiento del importante entorno antiviral frente a SARS-CoV-2.

Por otro lado, en contraste al estímulo de EOs con SARS-CoV-2, el estímulo con *PRRSV*, un virus que infecta y causa enfermedad en los cerdos, pero no en humanos, empleado como control negativo, no mostró un incremento en la expresión del receptor TLR-7, en la respuesta de estallido respiratorio y en la expresión del gen de *IFN-β*. Estas diferencias pueden explicarse primeramente por la divergencia entre especies. Aunque TLR7 porcino y humano son altamente conservados, la identidad global de aminoácidos ronda en  $\approx 85\%$ , suficiente para mantener estructura y señalización básicas, pero con un  $\approx 15\%$  de diferencia que puede afectar sitios críticos de unión y activación del receptor (especialmente en el ectodominio LRR que reconoce ARN viral y nucleótidos). Esta conservación “alta pero no idéntica” se documentó al clonar TLR porcino y al compárarlo con el TLR-7 humano para explicar respuestas funcionales distintas a ligandos tipo imidazoquinolina (Zhu *et al.*, 2008). La ausencia de respuesta de estallido respiratorio en EOs humanos por *PRRSV*, supone un doble obstáculo: (1) falta de activación óptima del TLR7 humano y 2) antagonismo en la producción de *IFN-I* por *PRRSV*. Esto último debido a que, en cerdos, *PRRSV* bloquea la inducción de *IFN-β* e *IRF-7*, así como la respuesta de estallido respiratorio (Darweesh *et al.*, 2025; Drake *et al.*, 2016).

Específicamente *PRRSV* suprime la producción de *IFN-β*, interfiriendo con IPS-1 (por sus siglas en inglés, *IFN-β Promoter Stimulator 1*) en la vía RIG-I/MDA5 (Luo *et al.*, 2008), promoviendo la degradación de TBK1 (serina/treonina quinasa) por autofagia mediada por chaperonas (vía HSPA8-LAMP2A), bloqueando la fosforilación de *IRF3/7* y, en consecuencia, la transcripción

de IFN-I (Chen et al., 2023; Wang *et al.*, 2021). En conjunto es coherente que el ARN de *PRRSV* no active eficientemente TLR-7 humano en EOs, aun cuando TLR-7 sea el sensor canónico de ssRNA en endosomas.

Resulta importante destacar que, con fines de bioseguridad, para este estudio utilizamos SARS-CoV-2 inactivado (i-SARS-CoV-2). A diferencia de un virus competente para la replicación, iSARS-CoV-2 no es capaz de replicarse, debido que el tratamiento térmico elimina el mecanismo infeccioso al desnaturalizar parcialmente las proteínas, incluidas las proteínas de la envoltura como Spike y al fragmentar el ARN. Sin embargo, los fragmentos de ARN y las porciones de proteínas sin desnaturalizar, son suficientes para activar TLR endosomales como TLR7/8 y otros receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (Lamy *et al.*, 2022). Por lo tanto, el uso de SARS-CoV-2 inactivado por calor constituye una herramienta experimental segura y válida para analizar los mecanismos de activación de leucocitos humanos. En este sentido, Van de Garde et al. (2024) demostraron que la estimulación de PBMCs con i-SARS-CoV-2 indujo una respuesta diferencial entre niños y adultos, caracterizada por una mayor secreción de IL-10 y GM-CSF (por sus siglas en inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) caracterizados por moderar la inflamación e impulsar una respuesta antiviral controlada, respectivamente, lo que conllevó a un equilibrio inmunológico más eficiente en los PBMCs pediátricos. Este hallazgo confirma que, aun sin capacidad replicativa, el virus inactivado conserva determinantes superficiales para promover la activación inmune y modular perfiles inflamatorios.

En conjunto, nuestros datos muestran que los EOs aislados de muestras sanguíneas de humano, más allá de su papel clásico en procesos alérgicos y parasitarios, son capaces de inducir de manera directa un entorno antiviral activo frente al virus SARS-CoV-2. Estos resultados subrayan el potencial de los EOs como efectores claves de la inmunidad innata antiviral, posicionándolos como un componente celular relevante en la defensa temprana contra el virus de COVID-19.

## **11. CONCLUSIÓN**

Nuestros datos sugieren que los eosinófilos de humano contribuyen a la eliminación del virus SARS-CoV-2, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y mediante la producción de IFN- $\beta$ , probablemente a través de la activación del receptor TLR-7 y de su vía de señalización.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Babadei, O., Strobl, B., Muller, M., & Decker, T. (2024). Transcriptional control of interferon-stimulated genes. *J Biol Chem*, 300(10), 107771. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107771>
- Bai, C., Zhong, Q., & Gao, G. F. (2022). Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci*, 65(2), 280-294. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>
- Blomberg, O. S., Spagnuolo, L., Garner, H., Voorwerk, L., Isaeva, O. I., van Dyk, E., Bakker, N., Chalabi, M., Klaver, C., Duijst, M., Kersten, K., Brüggemann, M., Pastoors, D., Hau, C. S., Vrijland, K., Raeven, E. A. M., Kaldenbach, D., Kos, K., Afonina, I. S., . . . Kok, M. (2023). IL-5-producing CD4(+) T cells and eosinophils cooperate to enhance response to immune checkpoint blockade in breast cancer. *Cancer Cell*, 41(1), 106-123.e110. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.11.014>
- Chen, X. X., Qiao, S., Li, R., Wang, J., Li, X., & Zhang, G. (2023). Evasion strategies of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Front Microbiol*, 14, 1140449. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1140449>
- Cortés-Vieyra, R., Gutiérrez-Castellanos, S., Álvarez-Aguilar, C., Baizabal-Aguirre, V. M., Nuñez-Anita, R. E., Rocha-López, A. G., & Gómez-García, A. (2021). Behavior of Eosinophil Counts in Recovered and Deceased COVID-19 Patients over the Course of the Disease. *Viruses*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/v13091675>
- Darweesh, M., Mohammadi, S., Rahmati, M., Al-Hamadani, M., & Al-Harrasi, A. (2025). Metabolic reprogramming in viral infections: the interplay of glucose metabolism and immune responses. *Front Immunol*, 16, 1578202. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1578202>
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., & Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663), 1529-1531. <https://doi.org/10.1126/science.1093616>
- Drake, M. G., Bivins-Smith, E. R., Proskocil, B. J., Nie, Z., Scott, G. D., Lee, J. J., Lee, N. A., Fryer, A. D., & Jacoby, D. B. (2016). Human and Mouse Eosinophils Have Antiviral Activity against Parainfluenza Virus. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 55(3), 387-394. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0405OC>
- Du, Y., Tu, L., Zhu, P., Mu, M., Wang, R., Yang, P., Wang, X., Hu, C., Ping, R., Hu, P., Li, T., Cao, F., Chang, C., Hu, Q., Jin, Y., & Xu, G. (2020). Clinical Features of 85 Fatal Cases of COVID-19 from Wuhan. A Retrospective Observational Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 201(11), 1372-1379. <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0543OC>

- Echavarria, R., Cardona-Munoz, E. G., Ortiz-Lazareno, P., Andrade-Sierra, J., Gomez-Hermosillo, L. F., Casillas-Moreno, J., Campos-Bayardo, T. I., Roman-Rojas, D., Garcia-Sanchez, A., & Miranda-Diaz, A. G. (2023). The Role of the Oxidative State and Innate Immunity Mediated by TLR7 and TLR9 in Lupus Nephritis. *Int J Mol Sci*, 24(20). <https://doi.org/10.3390/ijms242015234>
- Ferastraoaru, D., Hudes, G., Jerschow, E., Jariwala, S., Karagic, M., de Vos, G., Rosenstreich, D., & Ramesh, M. (2021). Eosinophilia in Asthma Patients Is Protective Against Severe COVID-19 Illness. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(3), 1152-1162.e1153. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.12.045>
- Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, 17(3), 638-650. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.034>
- Gabrielli, M., Candelli, M., Pignataro, G., Ojetti, V., Sacco Fernandez, M., Rosa, F., Gasbarrini, A., Franceschi, F., & COVID, o. b. o. G. A. (2023). Prevalence and Outcome of Asthma in Adult Patients Admitted to the Emergency Department for COVID-19: A Case-Control Study. *Applied Sciences*, 13(1), 44. <https://www.mdpi.com/2076-3417/13/1/44>
- García-García, E., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2013). A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. *J Vis Exp*(74). <https://doi.org/10.3791/50410>
- Gaur, P., Zaffran, I., George, T., Rahimli Alekberli, F., Ben-Zimra, M., & Levi-Schaffer, F. (2022). The regulatory role of eosinophils in viral, bacterial, and fungal infections. *Clin Exp Immunol*, 209(1), 72-82. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac038>
- Ghimire, R., Shrestha, R., Amaradhi, R., Liu, L., More, S., Ganesh, T., Ford, A. K., & Channappanavar, R. (2025). Toll-like receptor 7 (TLR7)-mediated antiviral response protects mice from lethal SARS-CoV-2 infection. *J Virol*, 99(5), e0166824. <https://doi.org/10.1128/jvi.01668-24>
- Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshev, V. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 19(3), 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Isobe, Y., Kato, T., & Arita, M. (2012). Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. *Front Immunol*, 3, 270. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00270>
- Jacobsen, E. A., Lesuer, W. E., Willetts, L., Zellner, K. R., Mazzolini, K., Antonios, N., Beck, B., Protheroe, C., Ochkur, S. I., Colbert, D., Lacy, P., Moqbel, R., Appleton, J., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2014). Eosinophil activities modulate the immune/inflammatory character of allergic respiratory responses in mice. *Allergy*, 69(3), 315-327. <https://doi.org/10.1111/all.12321>
- Jacobsen, E. A., Zellner, K. R., Colbert, D., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2011). Eosinophils Regulate Dendritic Cells and Th2 Pulmonary Immune Responses following Allergen Provocation. *The Journal of Immunology*, 187(11), 6059-6068. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102299>
- JM, R.-M. (2021). Eosinophil Response Against Classical and Emerging Respiratory Viruses: COVID-19. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 31 (2), 107. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0624>
- Kanda, A., Yun, Y., Bui, D. V., Nguyen, L. M., Kobayashi, Y., Suzuki, K., Mitani, A., Sawada, S., Hamada, S., Asako, M., & Iwai, H. (2021). The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. *Allergol Int*, 70(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.11.001>
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lamy, E., Rubio, C. P., Carreira, L., Capela e Silva, F., Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Lopez-Jornet, P., Ceron, J. J., & Tvarijonaviciute, A. (2022). Effect of thermal and chemical treatments used for SARS-COV-2 inactivation in the measurement of saliva analytes. *Scientific Reports*, 12(1), 9434. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13491-9>
- Lebourgeois, S., David, A., Chenane, H. R., Granger, V., Menidjel, R., Fidouh, N., Noël, B., Delelis, O., Richetta, C., Charpentier, C., Chollet-Martin, S., Descamps, D., Visseaux, B., & de Chaisemartin, L. (2022). Differential activation of human neutrophils by SARS-CoV-2 variants of concern. *Front Immunol*, 13, 1010140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1010140>
- Lee, J., Hayashi, M., Lo, J. F., Fearn, C., Chu, W. M., Luo, Y., Xiang, R., & Chuang, T. H. (2009). Nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation primes cells to a pro-inflammatory polarized response to

- a Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist. *Biochem J*, 421(2), 301-310.  
<https://doi.org/10.1042/bj20090013>
- Liang, Y., Wang, M.-L., Chien, C.-S., Yarmishyn, A. A., Yang, Y.-P., Lai, W.-Y., Luo, Y.-H., Lin, Y.-T., Chen, Y.-J., Chang, P.-C., & Chiou, S.-H. (2020). Highlight of Immune Pathogenic Response and Hematopathologic Effect in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-Cov-2 Infection [Review]. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01022>
- Luo, R., Xiao, S., Jiang, Y., Jin, H., Wang, D., Liu, M., Chen, H., & Fang, L. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Mol Immunol*, 45(10), 2839-2846.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.01.028>
- Macchia, I., La Sorsa, V., Urbani, F., Moretti, S., Antonucci, C., Afferni, C., & Schiavoni, G. (2023). Eosinophils as potential biomarkers in respiratory viral infections. *Front Immunol*, 14, 1170035.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1170035>
- Maurizio Gabrielli 1 , M. C., Giulia Pignataro, Veronica Ogetti, Marta Sacco Fernandez, Federico Rosa, Antonio Gasbarrini, Francesco Franceschi. (2023). Prevalence and Outcome of Asthma in Adult Patients Admitted to the Emergency Department for COVID-19: A Case-Control Study. *MDPI*. <https://doi.org/10.3390/app13010044>
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2023). *Atlas de histología vegetal y animal*.  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Megías M, M. P., Pombal MA. (2023). Atlas de histología vegetal y animal In.
- Merad, M., Blish, C. A., Sallusto, F., & Iwasaki, A. (2022). The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*, 375(6585), 1122-1127. <https://doi.org/10.1126/science.abm8108>
- Moore, K. M., Foster, S. L., Kar, M., Floyd, K. A., Elrod, E. J., Williams, M. E., Velden, J. V., Ellis, M., Malik, A., Wali, B., Lapp, S., Metz, A., Bosinger, S. E., Menachery, V. D., Seder, R. A., Amara, R. R., Kohlmeier, J. E., Grakoui, A., & Suthar, M. S. (2024). Eosinophils protect against SARS-CoV-2 following a vaccine breakthrough infection. *bioRxiv*.  
<https://doi.org/10.1101/2024.08.08.607190>
- Mortimer, P. M., Mc Intyre, S. A., & Thomas, D. C. (2021). Beyond the Extra Respiration of Phagocytosis: NADPH Oxidase 2 in Adaptive Immunity and Inflammation. *Front Immunol*, 12, 733918.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733918>

- Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., & Hirai, K. (2003). Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*, 171(8), 3977-3982. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.3977>
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance [Review]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- Pan, P., Shen, M., Yu, Z., Ge, W., Chen, K., Tian, M., Xiao, F., Wang, Z., Wang, J., Jia, Y., Wang, W., Wan, P., Zhang, J., Chen, W., Lei, Z., Chen, X., Luo, Z., Zhang, Q., Xu, M., . . . Wu, J. (2021). SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun*, 12(1), 4664. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25015-6>
- Phipps, S., Lam, C. E., Mahalingam, S., Newhouse, M., Ramirez, R., Rosenberg, H. F., Foster, P. S., & Matthaei, K. I. (2007). Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood*, 110(5), 1578-1586. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-071340>
- Porter, L., Toepfner, N., Bashant, K. R., Guck, J., Ashcroft, M., Farahi, N., & Chilvers, E. R. (2018). Metabolic Profiling of Human Eosinophils. *Front Immunol*, 9, 1404. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01404>
- Quinn, A. E., Zhao, L., Bell, S. D., Huq, M. H., & Fang, Y. (2025). Exploring Asthma as a Protective Factor in COVID-19 Outcomes. *Int J Mol Sci*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/ijms26041678>
- Samarasinghe, A. E., Melo, R. C., Duan, S., LeMessurier, K. S., Liedmann, S., Surman, S. L., Lee, J. J., Hurwitz, J. L., Thomas, P. G., & McCullers, J. A. (2017). Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Immunol*, 198(8), 3214-3226. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600787>
- Samarasinghe, A. E., Melo, R. C. N., Duan, S., LeMessurier, K. S., Liedmann, S., Surman, S. L., Lee, J. J., Hurwitz, J. L., Thomas, P. G., & McCullers, J. A. (2017). Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *The Journal of Immunology*, 198(8), 3214-3226. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600787>

- Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861-880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
- Shamri, R., Xenakis, J. J., & Spencer, L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*, 343(1), 57-83. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1049-6>
- Snow-Smith, M., Baker, P. J., Bohrer, A. C., Castro, E., Torres-Juarez, F., Anderson, C. F., Makiya, M. M., Sereti, I., Klion, A. D., & Mayer-Barber, K. D. (2023). Investigating a Role for Eosinophils in the Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *The Journal of Immunology*, 210(1\_Supplement), 73.10-73.10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.210.Supp.73.10>
- Someya, A., Nishijima, K., Nunoi, H., Irie, S., & Nagaoka, I. (1997). Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils--comparison of the NADPH oxidase components. *Arch Biochem Biophys*, 345(2), 207-213. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0252>
- Stevens, J. M., Syndercombe-Court, D., Oakervee, H. E., McCloskey, D., Jenner, M. J., Gribben, J. G., & Cavenagh, J. D. (2007). Development of original donor cell leukemia after successful engraftment from a second donor. *Blood*, 110(13), 4621-4622. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-104240>
- Sun, Y., Dong, Y., Wang, L., Xie, H., Li, B., Chang, C., & Wang, F. S. (2020). Characteristics and prognostic factors of disease severity in patients with COVID-19: The Beijing experience. *J Autoimmun*, 112, 102473. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102473>
- Sunjaya, A. P., Allida, S. M., Di Tanna, G. L., & Jenkins, C. (2022). Asthma and risk of infection, hospitalization, ICU admission and mortality from COVID-19: Systematic review and meta-analysis. *J Asthma*, 59(5), 866-879. <https://doi.org/10.1080/02770903.2021.1888116>
- Tanni, F., Akker, E., Zaman, M. M., Figueroa, N., Tharian, B., & Hupart, K. H. (2020). Eosinopenia and COVID-19. *J Am Osteopath Assoc*. <https://doi.org/10.7556/jaoa.2020.091>
- Trøseid, M., & Arribas, J. R. (2023). Which trial do we need? Management of elderly, fragile, fully vaccinated patients hospitalized for SARS-CoV-2 infection. *Clin Microbiol Infect*, 29(4), 419-421. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.01.006>
- Vorobjeva, N. V., Chelombitko, M. A., Sud'ina, G. F., Zinovkin, R. A., & Chernyak, B. V. (2023). Role of Mitochondria in the Regulation of Effector Functions of Granulocytes. *Cells*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/cells12182210>

- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, T. Y., Sun, M. X., Zhang, H. L., Wang, G., Zhan, G., Tian, Z. J., Cai, X. H., Su, C., & Tang, Y. D. (2021). Evasion of Antiviral Innate Immunity by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Front Microbiol*, 12, 693799. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693799>
- Yang, H., & Rao, Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*, 19(11), 685-700. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>
- Zaim, S., Chong, J. H., Sankaranarayanan, V., & Harky, A. (2020). COVID-19 and Multiorgan Response. *Curr Probl Cardiol*, 45(8), 100618. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100618>
- Zhang, J. J., Dong, X., Cao, Y. Y., Yuan, Y. D., Yang, Y. B., Yan, Y. Q., Akdis, C. A., & Gao, Y. D. (2020). Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 75(7), 1730-1741. <https://doi.org/10.1111/all.14238>
- Zhou, R., Zhang, Q., & Xu, P. (2020). TBK1, a central kinase in innate immune sensing of nucleic acids and beyond. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 52(7), 757-767. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa051>
- Zhu, J., Lai, K., Brownile, R., Babiuk, L. A., & Mutwiri, G. K. (2008). Porcine TLR8 and TLR7 are both activated by a selective TLR7 ligand, imiquimod. *Mol Immunol*, 45(11), 3238-3243. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.02.028>

## 13. ANEXOS

### 13.1 Oficio de la aprobación del Reglamento Interno y de Bioseguridad de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo para el proyecto de investigación.




Número de oficio: **CEIIB - UMSNH/164-2025**  
 Morelia, Michoacán, a 4 de abril de 2025  
**Asunto:** Notificación de Dictamen  
 Dictamen:067/2025

**RICARDA CORTÉS VIEYRA**  
**PRESENTE**

Con base en los artículos 46, 49, 51, 53, 58, 65, 67, 68 y demás relativos del Reglamento Interno de la Comisión de Ética en la Investigación, Investigación y de Bioseguridad de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por este medio se hace del conocimiento que una vez efectuada la revisión del **Proyecto de Investigación** titulado: **Estudio de la respuesta antiviral de los eosinófilos y de su potencial como biomarcadores en infecciones por virus respiratorios re-emergentes**, la Comisión de Ética en la Investigación, Investigación y Bioseguridad determinó lo siguiente al tenor de las observaciones abajo expresadas:

|            |                                            |          |
|------------|--------------------------------------------|----------|
| <b>I</b>   | <b>Aprobado</b>                            | <b>X</b> |
|            | <b>Pendiente de aprobación</b>             |          |
|            | A. Requiere de modificaciones menores      |          |
| <b>II</b>  | B. Requiere de modificaciones mayores      |          |
|            | C. Condicionado o en proceso de valoración |          |
| <b>III</b> | <b>No aprobado</b>                         |          |

**Observaciones del Comité De Investigación**

| Criterios para evaluar                    | Peso Aplicado (%) | Puntuación /Peso | Valor De Decisión en Porcentaje                                | 99              |
|-------------------------------------------|-------------------|------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------|
| Título y Presentación General             | 5                 | 5                | <b>Dictamen</b>                                                | <b>Aprobado</b> |
| Introducción                              | 5                 | 5                |                                                                |                 |
| Planteamiento del problema                | 10                | 10               |                                                                |                 |
| Hipótesis                                 | 5                 | 5                |                                                                |                 |
| Objetivos                                 | 5                 | 5                | 81% - 100% = Aprobado                                          |                 |
| Justificación                             | 5                 | 5                | 61% - 80% = Pendiente de Aprobación con Modificaciones Menores |                 |
| Marco Teórico o Revisión de la Literatura | 5                 | 5                | 41% - 60% = Pendiente de Aprobación con Modificaciones Mayores |                 |

Coordinación General de Estudios de Posgrado; Teléfono: (+52) (443) 322 3500; ext. 4155, 4156, 4194  
 Avenida Francisco I. Múgica S/N, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México. #HumanistaPerse

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

| Datos del manuscrito que se presenta a revisión |                                                                          |                          |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Programa educativo                              | Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas                |                          |
| Título del trabajo                              | "Estudio de la respuesta antiviral de los eosinófilos contra SARS-CoV-2" |                          |
|                                                 | Nombre                                                                   | Correo electrónico       |
| Autor/es                                        | Ararat Amezcua Arroyo                                                    | 2459654f@umich.mx        |
| Director                                        | Dr. Alejandro Bravo Patiño                                               | alejandro.bravo@umich.mx |
| Codirector                                      | Dra. Ricarda Cortés Vieyra                                               | ricarda.cortes@umich.mx  |
| Coordinador del programa                        | Dra. Elvira Núñez Anita                                                  | rosa.anita@umich.mx      |

| Uso de Inteligencia Artificial |             |             |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| Rubro                          | Uso (sí/no) | Descripción |
| Asistencia en la redacción     | No          |             |

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



| Uso de Inteligencia Artificial             |             |                                         |
|--------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|
| Rubro                                      | Uso (sí/no) | Descripción                             |
| Traducción al español                      | No          |                                         |
| Traducción a otra lengua                   | Si          | Traducción al inglés, en algunas ideas. |
| Revisión y corrección de estilo            | No          |                                         |
| Análisis de datos                          | No          |                                         |
| Búsqueda y organización de información     | No          |                                         |
| Formateo de las referencias bibliográficas | No          |                                         |
| Generación de contenido multimedia         | No          |                                         |
| Otro                                       | No          |                                         |

| Datos del solicitante |                                            |
|-----------------------|--------------------------------------------|
| Nombre y firma        | Ararat Amezcua Arroyo                      |
| Lugar y fecha         | Morelia Michoacán a 24 de febrero del 2026 |

# Ararat Amezcua Arroyo Ararat Amezcua Arroyo

## Estudio de la respuesta antiviral de los eosinófilos contra SARS-CoV-2.pdf

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:561100355

Fecha de entrega

26 feb 2026, 7:57 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

26 feb 2026, 8:01 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

Estudio de la respuesta antiviral de los eosinófilos contra SARS-CoV-2.pdf

Tamaño del archivo

3.0 MB

49 páginas

13.018 palabras

73.580 caracteres

# 20% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

## Fuentes principales

- 19%  Fuentes de Internet
- 16%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.