

PROYECTO DE INVESTIGACION FINAL

Evaluación in vitro de las drogas ivermectina y hemina como potencial tratamiento para aumentar la respuesta antiviral frente a la infección por SARS-CoV-2

Autor/es:

Minotti, Alan Agustin – LU 1095894

Carrera:

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Toro, Ayelen Rayen

Co-tutor:

Lic. Bizzotto, Juan Antonio

Año: 2021

PROYECTO FINAL DE LICENCIATURA

Evaluación *in vitro* de las drogas ivermectina y hemina como potencial tratamiento para aumentar la respuesta antiviral frente a la infección por SARS-CoV-2

Minotti, Alan Agustin – LU:1095894

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Toro, Ayelen Rayen
IQIBICEN-CONICET, CABA**

Co-Tutor:

**Bizzotto, Juan Antonio
IQIBICEN-CONICET, CABA
UADE, CABA**

Octubre 1, 2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

There is an art to science, and science in art; the two are not enemies, but different aspects of the whole.

-Isaac Asimov

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Dra. Elba Vazquez, por permitirme usar las instalaciones y darme la oportunidad de vivir esta experiencia en su laboratorio.

A la Dra. Geraldine Gueron y al Dr. Javier Cotignola por los consejos, la exigencia y la confianza.

A la Dra. Ayelen Toro, mi tutora. ¿Qué puedo decir? Realmente no me alcanzan las palabras de agradecimiento por todo el apoyo que recibí. En estos meses no fuiste solo una tutora, fuiste mi psicóloga, consejera, guía espiritual y no sé, ¡mil cosas más! Estoy eternamente agradecido de que hayas sido mi tutora y de que me hayas ayudado a recorrer este último trayecto de mi carrera. Espero algún día contagiarme un poquito de esa perseverancia tuya que te hace lograr absolutamente todo lo que te propones.

A todos los integrantes del Laboratorio de Inflamación y Cáncer, especialmente a Juan, Sofi, Pablito, Ro y Agus, gracias darme una mano gigante con todo, por explicarme las cosas mil veces, por tenerme paciencia y hacerme sentir tan cómodo en mi paso por el laboratorio.

A Javi, mi manager en Sanofi, que siempre priorizo mis estudios y fue super flexible con mi jornada laboral para que pudiese estudiar y realizar esta tesina.

A mis padres, Elisa y Marcelo, nada de esto hubiese sido posible sin su eterno y cálido apoyo. Gracias por acompañarme en cada decisión que tomé en mi vida.

A mi hermano, Fede, un pilar muy importante en mi vida, gracias por haberme dado el empujoncito que necesitaba.

A mi novia y compañera de cuarentana, Ori, gracias por todas las tardes que me bancaste estudiando o escribiendo, por todas esas hermosas palabras de aliento y esos abrazos reconfortantes que me ayudaron a seguir a lo largo de todo este año.

A mis amigos de siempre, Juan, Juli, Eli y Vicky, básicamente por lo que son, por estar siempre, por compartir conmigo todas las alegrías y las tristezas, por esas noches de catarsis y por todas las charlas motivacionales.

A mis amigas de la facultad, Cami y Mini, por hacerme más fácil la cursada y siempre darme una mano en todo lo académico.

A Estefanía.

Resumen

El Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo de tipo 2 (SARS-CoV-2) es un nuevo virus y agente causal de la enfermedad del Coronavirus 2019 (COVID-19). Dada la urgente necesidad de fármacos para frenar los contagios por COVID-19, una de las estrategias más valiosas es el reposicionamiento de drogas. El objetivo del presente proyecto fue estudiar la acción antiviral de las drogas ivermectina (IVM) y hemina en células epiteliales de pulmón. Ambos fármacos se encuentran aprobados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso terapéutico en humanos. Basándonos en antecedentes previos de nuestro grupo y de otros grupos de investigación, planteamos como hipótesis que las drogas IVM y hemina pueden potenciar la acción antiviral frente a la infección por SARS-CoV-2. Utilizamos células epiteliales pulmonares humanas (línea celular A549) como modelo experimental y evaluamos la expresión de genes relacionados con la infección por SARS-CoV-2, de genes antivirales y de genes anti-inflamatorios mediante RT-qPCR. En primer lugar, establecimos las dosis óptimas de hemina y IVM en este modelo experimental. A continuación, cultivamos las células A549 con hemina e IVM, solas o en combinación, a diferentes tiempos. Encontramos que el tratamiento con IVM aumentó la expresión de *MX1*, un gen cuya expresión se induce por IFN- γ y se ha demostrado su acción antiviral contra una gran diversidad de virus. Además, en este modelo *in vitro*, la hemina indujo la expresión de *HMOX1*, gen que codifica para la proteína anti-inflamatoria HO-1, y la combinación con IVM potenció dicha inducción. En cuanto a las proteínas asociadas a la entrada del virus en la célula huésped, encontramos que tanto la IVM como la hemina disminuyeron la expresión de *BSG*, un receptor de membrana que facilita la entrada del SARS-CoV-2, y que la combinación de estos fármacos aumentó la expresión de *ADAM17*, cuya actividad está relacionada con la inhibición de la infección viral. Por último, simulamos un estado de infección viral utilizando Poly (I:C), un análogo sintético del ARN de doble cadena viral. El tratamiento con Poly (I:C) aumentó las expresiones de *NFKB1* e *IRF3*, confirmando la sensibilidad de las células A549 al Poly (I:C). En este contexto, el tratamiento con IVM también generó un aumento en la expresión de *MX1* y la hemina indujo la expresión de *HMOX1*. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el tratamiento combinado de hemina con IVM posee un efecto antiviral.

Abstract

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a novel virus that is the causal agent of the Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Given the urgent need for drugs to halt COVID-19 infection, one of the most valuable strategies is drug repurposing. The aim of this project was to study the antiviral effect of hemin and ivermectin (IVM) in lung epithelial cells. Both drugs are approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the National Administration of Medicines, Food and Medical Technology (ANMAT) for therapeutic use in humans. Based on previous work by our group and other research groups, we hypothesize that IVM and hemin could act as antiviral drugs against SARS-CoV-2 infection. As experimental model we used human pulmonary epithelial cells (A549 cell line) and we evaluated the expression of genes related to SARS-CoV-2 infection, antiviral genes, and anti-inflammatory genes by RT-qPCR. First, we established the optimal doses of hemin in our experimental model. Then, we cultured A549 cells with hemin and IVM, alone or in combination, during different timepoints. We found that IVM treatment resulted in increased levels of *MXI*, a gene whose expression is induced by IFN-I and has been shown to have an antiviral action against a great diversity of viruses. Moreover, in this *in vitro* model, hemin induced the expression of *HMOX1*, a gene that encodes for the anti-inflammatory protein HO-1, and in combination with IVM such effect was even higher. Concerning the proteins associated with the virus entry into the host cell, we found that both IVM and hemin decreased the expression of *BSG*, a membrane receptor that facilitates SARS-CoV-2 entry, and in turn, the combination of these drugs increased the expression of *ADAM17*, whose activity is related to viral entry inhibition. Finally, we mimicked viral infection using Poly (I:C), a synthetic analog of viral double-stranded RNA. Poly (I:C) treatment increased *NFKB1* and *IRF3* expressions, validating the Poly (I:C) responsiveness of A549 cells. In this viral simulation context, IVM treatment also boosted *MXI* expression and hemin induced *HMOX1*. Altogether, our results ascertain the potential antiviral action of hemin and IVM combination.

Abreviaturas

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina II

ADAM17: Metaloproteasa 17

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ANOVA: Análisis de la varianza

AP-1: Proteínas activadora 1

ARDS: Síndrome de dificultad respiratoria aguda

ARN: Ácido ribonucleico

BR: Bilirrubina

BSG: Proteína basigin

BV: Biliverdina

BVR: Biliverdin reductasa

CD147: Cluster de diferenciación 147

CO: Monóxido de carbono

COVID-19: Enfermedad del Coronavirus 2019

CTSB: Catepsina B

CTSL: Catepsina L

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dsRNA: Ácido ribonucleico de doble cadena

FDA: *Food and Drug Administration*

Fe: Hierro

FtH: Cadena pesada de la ferritina

HIF-1 α : Factor Inducible por Hipoxia 1 α

HO-1: Hemo oxigenasa-1

HSP27: Proteína de choque térmico 27

IFNAR1/2: Receptor de interferón α - β 1/2

IFN-I: Interferón de tipo I

IKK ϵ : Inhibidor de κ -B quinasa ϵ

IL: Interleucina

IMP: Importina

IN: Proteína integrasa

IRF3: Factor regulador de interferón 3

ISGs: Genes estimulados por interferón

ISREs: Elementos de respuesta estimulados por el IFN-I

IVM: Ivermectina

MAVS: Proteína de señalización antiviral mitocondrial

MCP1: Proteína quimioatrayente de monocitos

MERS: Síndrome respiratorio de Medio Oriente

MIP-1 β : proteína inflamatoria de macrófagos-1 β

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MX1: Proteína de resistencia a mixovirus humano

MyD88: Proteína 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF κ B: Factor nuclear κ B

NOX: NADPH oxidasas

NPC: Complejo de poros nucleares

NRF2: Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2, tipo 2

NSP: Proteína no estructural

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierta

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PKG: Proteína quinasa G

PKR: Proteína quinasa R

Poly (I:C): Poly inosina:citosina

RBD: Dominio de unión al receptor

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN

RIG-I: Gen 1 inducible por ácido retinoico

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SARS-CoV-2: Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo de tipo 2

SFB: Suero fetal bovino

sGC: Guanilil ciclasa soluble

STAT 1/2: Transductor de señales y activador de la transcripción 1/2

TLR: Receptores tipo toll

TMPRSS2: Proteasa transmembrana serina 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TNF- β : Factor de necrosis tumoral β

TRAF3: Factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Contenido

Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	5
Abreviaturas	6
Contenido	9
Introducción	12
Características del SARS-CoV-2.....	14
Mecanismos de infección del SARS-CoV-2	15
Respuesta vía Interferón de tipo I.....	17
COVID-19 e Inflamación	21
Generalidades de hemo oxigenasa 1	23
Hemo oxigenasa 1 en distintas patologías	25
Reposicionamiento de drogas para tratamiento de COVID 19	27
Hipótesis y Objetivos	31
Hipótesis	31
Objetivos.....	32
Metodología	33
Cultivo celular	33
Tratamientos	33
Viabilidad celular.....	34
Extracción de ARN.....	34
Cuantificación del ARN	35
Preparación del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT).....	35
PCR en tiempo real o cuantitativa	35
Tratamiento con Poly inosina:citosina.....	37
Análisis estadístico	38
Resultados	39
Establecimiento de las concentraciones óptimas de hemina e ivermectina.....	39
Efecto del tratamiento con hemina e IVM sobre la expresión de genes antivirales y anti-inflamatorios	42
Discusión	57
Conclusiones y Perspectivas a futuro	64

Conclusión64

Perspectivas a futuro64

Bibliografía.....65

Introducción

La enfermedad del coronavirus 19 (COVID-19) es una enfermedad infecciosa causada por el SARS-CoV-2 (del inglés *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). El 31 de enero del 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de pandemia debido a este nuevo coronavirus (World Health Organization, 2020). Al día 14 de septiembre del 2021, un total de 219 millones de personas han sido infectadas con SARS-CoV-2 y se han acumulado un total de 4,55 millones muertes a nivel mundial (World Health Organization, 2021).

Frente a la necesidad urgente de la existencia de fármacos que permitan frenar la cadena de contagios de COVID-19, una de las estrategias más valiosas es el reposicionamiento de drogas. Este método consiste en utilizar una droga cuyo uso ya fue establecido para el tratamiento de una enfermedad distinta. La utilización de fármacos para más de un propósito permite reducir costos, tiempo y los riesgos del proceso de desarrollo de medicamentos (Li Yan, *et al*, 2020). En base a esta estrategia decidimos evaluar la combinación de ivermectina (IVM) y hemina, dos drogas previamente aprobadas por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y la *Food and Drug Administration* (FDA) para estudiar su potencial acción antiviral contra el SARS-CoV-2. La IVM es una droga antiparasitaria, inicialmente de uso veterinario, la cual luego fue aprobada por el ANMAT en nuestro país para uso terapéutico en humanos (González *et al*, 2012). Además de su actividad antiparasitaria, diversos grupos de investigación han demostrado actividad antiviral de la IVM en modelos *in vitro* (Caly *et al*, 2020). Por otro lado, la hemina, es una droga aprobada por el ANMAT para el tratamiento contra las porfirias, una enfermedad genética asociada a la biosíntesis del grupo hemo (Anderson *et al*, 2005). La expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1), la enzima limitante en la degradación del grupo hemo puede inducirse frente a estímulos pro-inflamatorios como lipopolisacáridos, citocinas y prostaglandinas (Grochot-Przeczek *et al*, 2012). Así, a HO-1 se le han atribuido propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorias y anti-apoptóticas (Dulak *et al*, 2008). A su vez, diversos estudios han reportado que HO-1 puede ejercer una actividad antiviral contra una amplia variedad de virus (Cueno *et al*, 2012; El Kalamouni *et al*, 2019; Hill-Batorski *et al*, 2013; Protzer *et al*, 2007).

Basándonos en los antecedentes mencionados planteamos como objetivo general de este proyecto estudiar la acción antiviral de las drogas IVM y hemina (inductor específico de HO-

1) frente a la infección por SARS-CoV-2. Para ello, dado el tropismo del virus SARS-CoV-2 por el tejido pulmonar, trabajaremos con la línea celular A549 (células de epitelio pulmonar humano).

A continuación, se describen los antecedentes, incluyendo aquellos relacionados con la etiología y patogenia del SARS-CoV-2, con la respuesta antiviral vía IFN-I y la respuesta anti-inflamatoria, así como también se incluye una descripción sobre HO-1 y MX1, dos de las principales proteínas estudiadas en el presente trabajo. Sobre el final de los antecedentes, se destacan las ventajas de la estrategia del reposicionamiento de drogas. Luego, se detalla la metodología por la cual se obtuvieron los resultados expuestos, continuando con el planteo de la hipótesis, el objetivo general y los objetivos específicos. Para finalizar, se describen los resultados obtenidos, en la discusión dichos datos se interpretan incluyendo antecedentes de distintos grupos de investigación y se cierra el presente trabajo con una conclusión final incluyendo las perspectivas a futuro.

Antecedentes

Características del SARS-CoV-2

El 31 de enero del 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de pandemia debido a un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2 (del inglés *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) causante de la enfermedad COVID-19 (World Health Organization, 2020). Al día 14 de septiembre del 2021, 219 millones las personas fueron infectadas con SARS-CoV-2 y se acumularon un total de 4,55 millones de muertes a nivel mundial (World Health Organization, 2021).

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los *Coronaviridae* y a la subfamilia *Coronavirinae*, ya que es un virus a ARN monocatenario positivo, presenta forma esférica y una nucleocápside helicoidal rodeada de una envoltura cubierta de partículas con forma de espiga las cuales le dan el aspecto de corona (Nyayanit *et al*, 2021). Junto con el SARS-CoV y el bat SARS-like CoV, pertenece al género *Betacoronavirus* (Perlman, 2020). Dentro de la familia *Coronaviridae* se encuentran patógenos entéricos y del tracto respiratorio, generalmente asociados con una enfermedad leve o asintomática. Sin embargo, el SARS, el coronavirus del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS) y el SARS-CoV-2 pueden causar enfermedades respiratorias graves (Payne, 2017). Si bien la enfermedad COVID-19 se caracteriza por una extensa sintomatología, los síntomas más comunes son fiebre, tos, fatiga, dolor de cabeza y diarrea, aunque en algunos pacientes puede aumentar la severidad de la enfermedad causando disnea e inclusive hipoxemia, la cual puede derivar en el fallecimiento de paciente (Berlin *et al*, 2020). A su vez, se ha registrado una extensa cantidad de casos clínicos en los cuales los pacientes sufren secuelas luego de cursar la enfermedad. Se han descrito secuelas a nivel cardiovascular como la miocarditis, a nivel pulmonar es muy frecuente la disfunción pulmonar causando incluso fibrosis y a nivel neuronal una anosmia a largo plazo y problemas a nivel cognitivo (Del Rio *et al*, 2020).

En cuanto al genoma de los Coronavirus, el del SARS-CoV-2 tiene una longitud aproximada de 30 kpb, siendo el genoma más largo conocido para los virus de ARN (Brian & Baris, 2005), y está compuesto por 6 marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open reading frame*): ORF1ab, ORF3a, ORF6, ORF7ab, ORF8 y ORF10. Dos tercios del genoma del SARS-CoV-2 codifican para 16 proteínas no estructurales (nsp, del inglés *non structural protein*):

nsp1–16 (Gordon *et al*, 2020; Wu *et al*, 2020; Li *et al*, 2020), el tercio restante codifica para proteínas estructurales: la proteína de la espiga (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la nucleocápside (N) (Mehmood, 2021) (**Figura 1**).

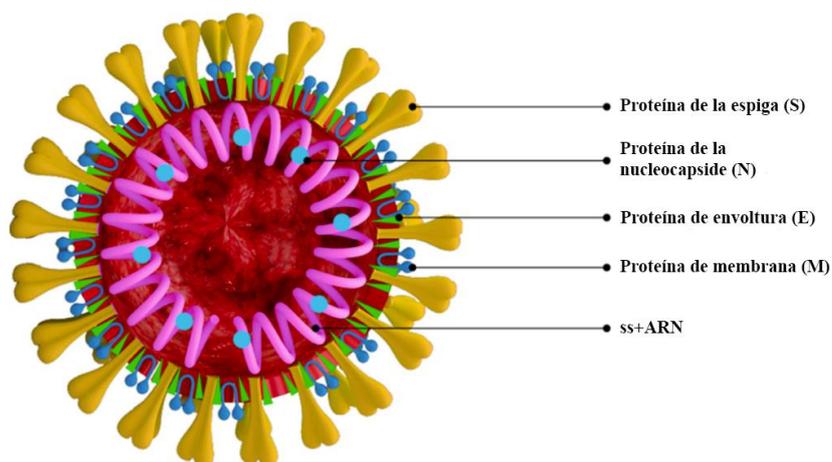


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 posee cuatro proteínas estructurales: la proteína de la espiga (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la nucleocápside (N). Su genoma consiste en un ARN de simple cadena (ss+ARN). Figura adaptada (Dos Santos, 2021).

Mecanismos de infección del SARS-CoV-2

El ingreso del SARS-CoV-2 a la célula huésped puede darse mediante dos vías: la unión a receptores específicos de membrana o endocitosis. El primer mecanismo de entrada está mediado principalmente por la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2). A su vez, la proteína basigin (BSG), también conocida como cluster de diferenciación 147 (CD147), puede mediar el ingreso del virus a la célula (Wang *et al*, 2020). Con respecto a ACE2, es una proteína de membrana de tipo I que se expresa principalmente en pulmones, corazón, riñones e intestino y su principal función fisiológica es la maduración de la angiotensina, una hormona peptídica que controla la vasoconstricción y, por lo tanto, la presión arterial. Por otro lado, BSG es una glicoproteína transmembrana con dos dominios similares a las inmunoglobulinas y posee un rol fundamental en el reconocimiento intracelular, la diferenciación celular y el desarrollo (Muramatsu y Miyauchi, 2003).

Para que la envoltura viral pueda fusionarse con la membrana celular luego de la unión con ACE2, la proteína S debe activarse proteolíticamente. Una vez que el dominio de unión al receptor (RBD, del inglés *receptor binding domain*) de la proteína S se ha unido a ACE2, la

subunidad S1 es escindida de la subunidad S2, por medio de la proteasa transmembrana serina 2 de la superficie celular (TMPRSS2) permitiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y, en consecuencia, el ingreso de la nucleocápside (Hoffmann *et al*, 2020; Glebov, 2020) (**Figura 2**).

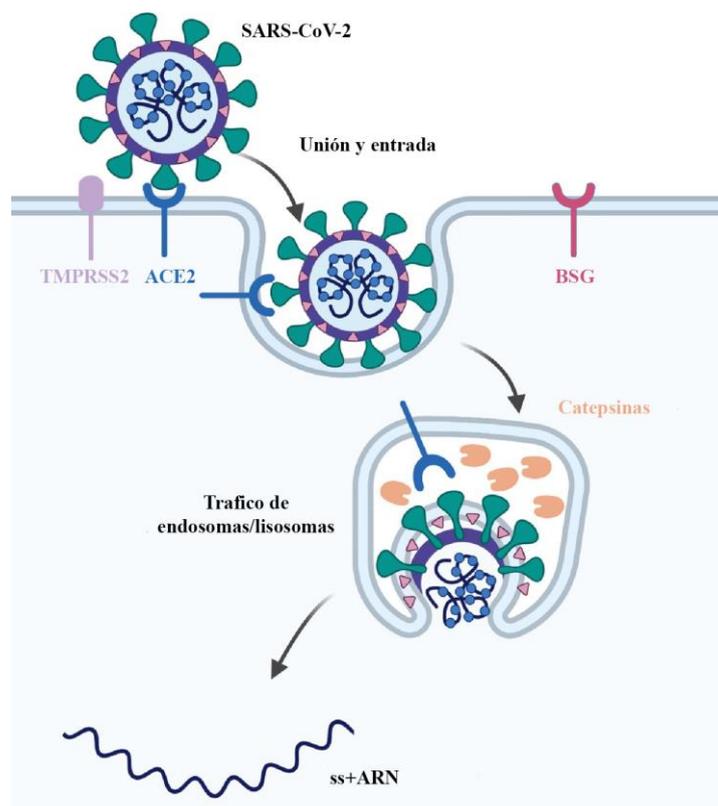


Figura 2. Ingreso del SARS-CoV-2 a la célula huésped. El mecanismo de infección del SARS-CoV-2 se puede dar a través de dos receptores que se encuentran en la superficie de la célula huésped, la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) y a la proteína basigin (BSG). Para que la envoltura viral pueda fusionarse con la membrana celular luego de la unión con ACE2, la proteína S debe activarse proteolíticamente. En el caso de la unión de la proteína S a BSG, la activación de la proteína viral S puede ser catalizada mediante distintas proteasas de la célula huésped. A su vez, el SARS-CoV-2 puede ingresar mediante endocitosis. Figura adaptada (Harrison *et al*, 2020).

Por otro lado, aún no ha sido completamente dilucidado el mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 a través de BSG. Sin embargo, para el SARS-CoV, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del sarampión, se ha identificado que la peptidilprolil isomerasa A y la peptidilprolil isomerasa B, se incorporan al virus y facilitan la unión a BSG (Ahmetaj-Shala *et al*, 2020). Además, se ha demostrado que la activación de la proteína viral S puede ser catalizada mediante distintas proteasas de la célula huésped, entre ellas furinas, tripsinas y

catepsinas, siendo determinante la disponibilidad de estas proteasas para mediar el ingreso del SARS-CoV-2 a la célula huésped a través de la membrana plasmática o por endocitosis (Ou *et al*, 2020). Son de particular importancia la catepsina B (CTSB) y la catepsina L (CTSL), ya que se ha reportado que presentan alta eficacia clivando a la proteína S y permitiendo el ingreso del virus a la célula (Jaimes *et al*, 2020). CTSB y CTSL se encuentran presentes en los endosomas y actúan luego de la endocitosis del virus, facilitando la fusión de las membranas viral y endosomal (Padmanabhan *et al*, 2020).

Por otra parte, con respecto al mecanismo de ingreso del SARS-CoV-2 por endocitosis, este dependerá del tipo de célula huésped. Dentro de los mecanismos de ingreso del SARS-CoV-2 mediante endocitosis se han identificado: endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis mediante caveolas y endocitosis a través de balsas lipídicas.

Respuesta vía Interferón de tipo I

Una vez que el virus ingresa al interior de la célula, el sistema inmune del huésped reconoce los ARN virales que actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), provocando la respuesta inmune por medio de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) presentes en las células inmunes (Streicher y Jouvenet, 2019; Le Bon, 2020). Los principales PRR involucrados en la respuesta inmune son los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll Like Receptor*) presentes en endosomas: TLR3, TLR7 y TLR8 (Takeuchi y Shizuo, 2010; Ivashkiv y Donlin, 2014). También participa el sensor citosólico, el gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-I) y el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) (Li *et al*, 2010).

Una vez que los TLR reconocen las firmas moleculares de patógenos inician una cascada mediada por la proteína 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), una proteína clave para la mayor parte de las vías de señalización inflamatorias dependientes de TLR. MyD88 interactúa con una gran variedad de proteínas celulares que conducen a la activación de NFκB, un factor de transcripción esencial para la regulación positiva de numerosos genes involucrados en la respuesta inmune, así como también para la inducción de citocinas inflamatorias, quimiocinas e interferones de tipo I (IFN-I) (O'Neill y Bowie, 2007). Además, se ha demostrado que MyD88 interactúa con el factor regulador de interferón 7 (IRF7, del inglés *Interferon Regulatory Factor*) promoviendo la activación de los

promotores de IFN-I (Iliev, 2011). Por otro lado, RIG-I y MDA5 interactúan con la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS). La activación de MAVS conduce, a través del reclutamiento del factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF3), a la fosforilación de IRF3 e IRF7. Tras su fosforilación, dichos factores se dimerizan y son translocados al núcleo, donde inducen la expresión de genes de IFN-I, así como también la expresión de genes que codifican citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión. Este mecanismo de acción resulta en el reclutamiento de leucocitos y proteínas plasmáticas en el sitio de la infección con el fin de combatir la infección viral en curso (Thompson *et al*, 2011).

En particular, se ha demostrado que los IFN-I tienen potentes efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores. En los seres humanos la familia de IFN-I está codificada por un solo gen de IFN- β , una docena de genes de IFN- α , además de varios genes para IFN- ϵ , κ , τ , δ , ζ , ω . Todos los subtipos de IFN-I señalizan a través de receptores IFNAR1-IFNAR2, resultando en la activación de JAK1/TYK2 seguida de STAT1/2 e IRF9. La activación de los factores de transcripción STAT1/2 e IRF9 desencadenan la inducción de cientos de genes estimulados por interferón (ISG, del inglés *Interferon-Stimulated Genes*) (Sa Ribero *et al*, 2020), que restringen la replicación viral mediante diversos mecanismos (Teijaro, 2016; Levy *et al*, 2011) (**Figura 3**).

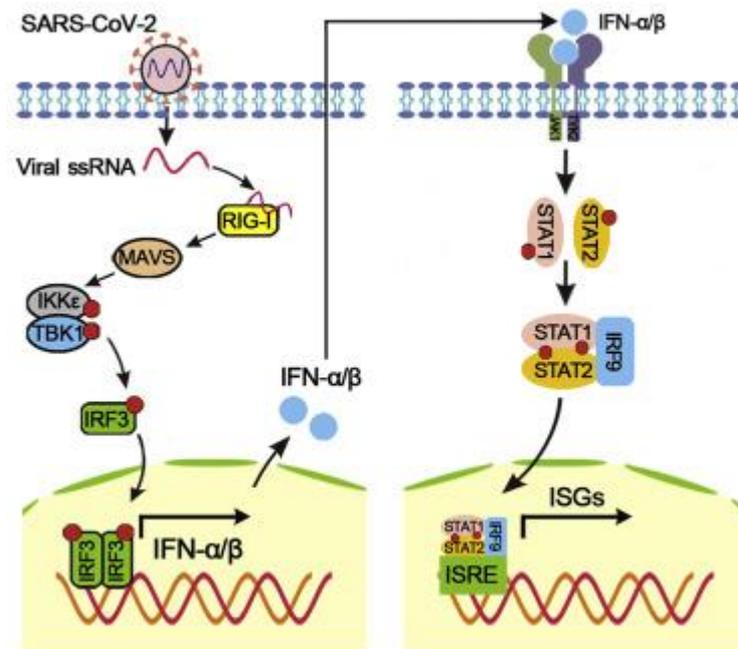


Figura 3. Activación de la vía de IFN-I. Al inicio de la infección los antígenos virales son reconocidos por distintas proteínas, como TLRs y RIG-I. Dicho reconocimiento genera la activación del inhibidor de κ -B quinasa ϵ (IKK ϵ) y de la quinasa TBK1 vía MAVS. TBK1 fosforila a IRF3 promoviendo su translocación al núcleo, donde induce la transcripción de los genes de IFN-I (**izquierda**). Los IFN-I se secretan y la unión a sus receptores de membrana genera la activación de una cascada de señalización que culmina en la fosforilación de STAT1 y STAT2 y en la formación de un complejo con IRF9. Dicho complejo se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta estimulados por el IFN-I (ISREs), desencadenando la expresión de cientos de ISGs con funciones antivirales (**derecha**). Figura adaptada (Xia *et al*, 2020).

Dentro de los ISGs se encuentran genes como *EIF2AK2* que codifica para la proteína quinasa activada por dsRNA (PKR), la cual inhibe la síntesis de proteínas impidiendo así la replicación viral. Otra familia de ISGs que influye sobre la traducción son las proteínas relacionadas con p56, una proteína que bloquea la acción del factor de iniciación de la traducción EIF3 cuando el inicio de la traducción está mediado por un sitio de entrada interno del ribosoma (Borden *et al*, 2007). Un último ejemplo de ISGs que queremos destacar son los genes de resistencia a mixovirus humanos (*MX*) que codifican para dos proteínas: MX1 y MX2, las cuales difieren en su mecanismo de acción. Por un lado, MX1 está asociada a la respuesta antiviral contra una gran diversidad de virus como, por ejemplo: Orthomyxovirus, Paramyxovirus, Rhabdovirus, Togavirus, Bunyavirus, Coxsackie virus y Hepatitis B (Pavlovic *et al*, 1990; Pavlovic, 1992; Kochs *et al*, 2022; Verhelst *et al*, 2013). Su acción antiviral reside en el reconocimiento de las nucleoproteínas virales, evitando que las nucleocápsides sean transportadas al núcleo, inhibiendo así la replicación viral (Haller *et al*, 2007). Por otra parte,

el rol antiviral de MX2 se ha descrito principalmente frente a la infección VIH, donde reduce la integración del ADN viral inhibiendo su replicación (Fricke *et al*, 2014) (**Figura 4**).

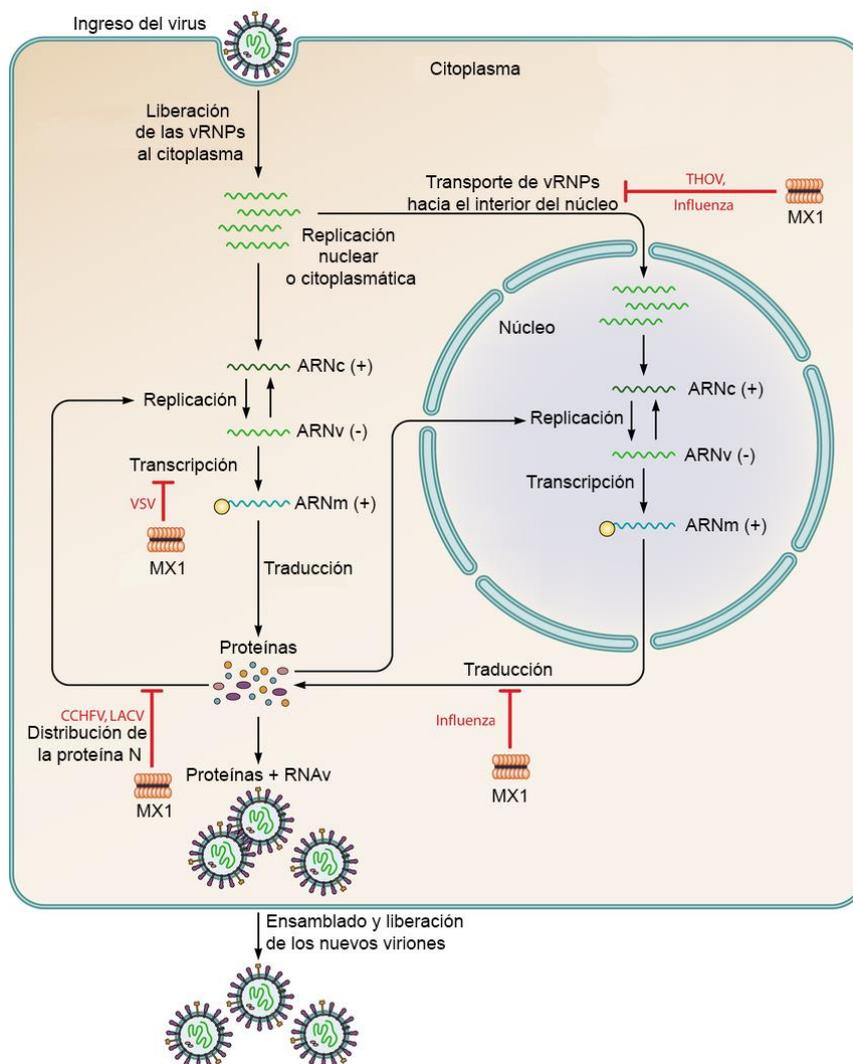


Figura 4. Mecanismos de acción antivirales de la proteína MX1. Se ha reportado que MX1 inhibe el transporte nuclear de los virus Thogoto e Influenza, la transcripción del virus de la Estomatitis Vesicular, la redistribución de proteínas del virus La Crosse y el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y la traducción de proteínas del virus de la influenza. Figura adaptada (Verhelst *et al*, 2013).

COVID-19 e Inflamación

La respuesta inflamatoria juega un papel crucial en las manifestaciones clínicas de la enfermedad COVID-19. Una vez que se produce la infección por SARS-CoV-2, se desencadena una respuesta inmune contra el virus, que de no ser controlada puede generar una lesión pulmonar aguda o asociarse con el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, del inglés *Acute Respiratory Distress Syndrome*) que puede derivar en una falla multiorgánica y hasta incluso en la muerte (Ragab *et al*, 2020).

Luego del reconocimiento de los PAMPs por medio de los TLR se produce la activación de los factores de transcripción NFκB, IRF3 y AP-1, que inducen la expresión de factores inflamatorios como INF-I/III y quimiocinas (Zabetakis *et al*, 2020). De esta manera se produce una ola de inflamación local que implica un aumento de la secreción de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas como IL-6, IL-1, TNF-α, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1) y proteína inducible por interferón-γ (IP-10) e IFN-I (Huang *et al*, 2020). La secreción de estas citocinas y quimiocinas atrae a células inmunes, en particular a los monocitos y los linfocitos T (Qin *et al*, 2020). Los linfocitos T del sistema inmune adaptativo están involucrados en la respuesta antiviral. Por un lado, los linfocitos T helper, promueven la producción de anticuerpos específicos contra el virus mediante la activación de linfocitos B, mientras que los linfocitos T citotóxicos son capaces de atacar a las células infectadas por el virus. Además, los linfocitos T helper producen citocinas y quimiocinas proinflamatorias a través de la vía de señalización de NFκB. Así, se reclutan linfocitos y leucocitos, como monocitos y neutrófilos, hacia el sitio de la infección, con la posterior secreción de grandes cantidades de quimiocinas y citocinas, amplificando la respuesta inflamatoria contra la infección viral (Zabetakis *et al*, 2020) (**Figura 5**). En la mayoría de los individuos, las células reclutadas se encargan de eliminar la infección, luego la respuesta inmune disminuye y los pacientes se recuperan. Sin embargo, en algunos pacientes, se produce una respuesta inmune exacerbada, que desencadena una tormenta de citocinas que genera un estado de inflamación generalizada.

En este sentido, existen diversas proteínas con actividad anti-inflamatoria. Nuestro interés se centra principalmente en hemo oxigenasa 1 (HO-1), la enzima que cataliza la degradación del grupo hemo (Lee y Chau, 2002). HO-1 ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio en el contexto tumoral y hemos reportado que presenta un rol clave como

modulador de la angiogénesis en cáncer de próstata a través de la represión de la vía de NFκB (Ferrando *et al*, 2011).

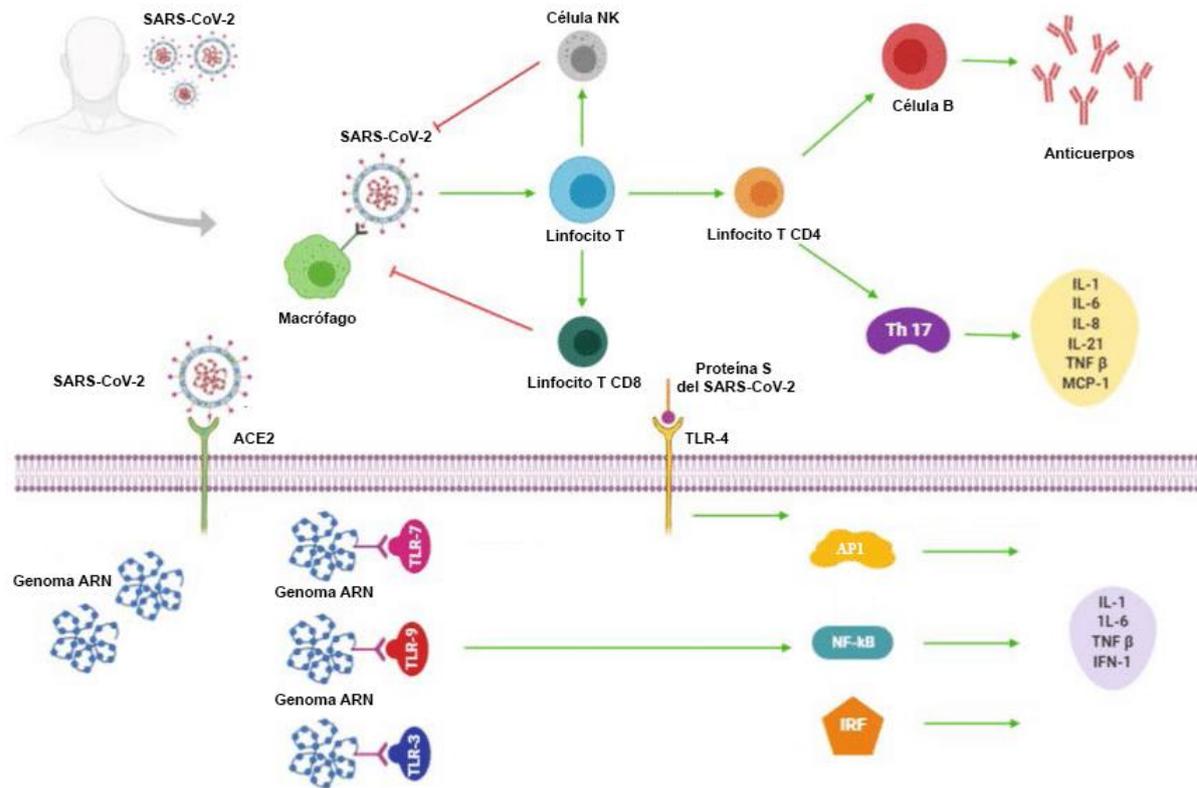


Figura 5. Respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2. La cascada de la inflamación se inicia a través de la unión del SARS-CoV-2 a los macrófagos que presentan sus antígenos a los linfocitos T CD4, generando su activación y también su diferenciación a linfocitos T helper (Th). Luego, se producen interleucinas (IL) 1, 6, 8 y 21, el factor de necrosis tumoral β (TNF-β) y MCP-1 que inducen la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos T colaboran con la activación de las células B que son las responsables de producir anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2. El ingreso del SARS-CoV-2 y el reconocimiento de sus antígenos desencadena la producción de citocinas proinflamatorias a través de MyD88. A continuación, se genera la activación de NFκB, la producción de IL-1 e IL-6, además de IFN-I y TNF-β. A su vez, se puede dar la unión del ARN viral a través del receptor TLR-3, TLR-4, TLR-7 y/o TLR-9. Figura adaptada (Arruda de Souza Monnerat *et al*, 2021).

Generalidades de hemo oxigenasa 1

Hemo oxigenasa 1, una enzima de 32 kDa codificada por el gen *HMOX1* (Ryter y Choi, 2016), fue descrita por primera vez en el año 1969 por Raimo Tenhunen, quien pudo identificarla como una enzima microsomal inducible, la cual a través de la degradación del grupo hemo genera como productos de la reacción enzimática cantidades equimolares de CO, bilirrubina (la cual es generada a partir de biliverdina por la biliverdin reductasa) y Fe^{2+} (Tenhunen *et al*, 1969). Se ha reportado que HO-1 presenta propiedades antiapoptóticas, antioxidantes y anti-inflamatorias a través de sus productos de reacción (Ryter y Choi, 2016). Tanto la bilirrubina como la biliverdina son pigmentos biliares que cumplen un rol muy importante en la protección antioxidante. En este sentido, la bilirrubina es capaz de eliminar especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*) como radicales hidroxilo, oxígeno singlete y aniones superóxido, reciclándose nuevamente en biliverdina. La actividad citoprotectora de biliverdina / bilirrubina se basa en la inhibición de la peroxidación de lípidos y proteínas. Además de las propiedades antioxidantes, la bilirrubina también posee potencial anti-inflamatorio atenuando el rodamiento de leucocitos, e inhibe la cascada del complemento. Por otro lado, el CO es una molécula de señalización que modula muchos procesos fisiológicos. Se ha demostrado que activa la guanilato ciclasa soluble y, por lo tanto, inhibe la agregación plaquetaria, disminuye la adhesión de leucocitos, provoca la relajación de los vasos sanguíneos, suprime la apoptosis de las células e induce la síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF del inglés *vascular endothelial growth factor*). Además, el CO ejerce efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de la síntesis de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL 1 β), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β) y, a su vez, regula la expresión de la interleucina-10 (IL-10). Por último, la liberación de Fe^{2+} del grupo hemo puede conducir a la protección frente al estrés oxidativo, aunque los iones Fe^{2+} libres son tóxicos debido a la capacidad de interactuar con oxidantes celulares para generar radicales hidroxilo, en este caso, el efecto citoprotector del producto HO-1 es indirecto: el Fe^{2+} estimula la expresión de ferritina, la proteína de almacenamiento de hierro, que posee propiedades antioxidantes (Grochot-Przeczek *et al*, 2012) (**Figura 6**).

La expresión de HO-1 puede aumentar en respuesta a distintos estímulos y contextos, por ejemplo, es sabido que se induce frente a condiciones de estrés celular y a estímulos pro-

oxidativos como el aumento de los niveles de hemo y de ROS, así como también frente a estímulos pro-inflamatorios como lipopolisacáridos, las citocinas proinflamatorias, y las prostaglandinas (Grochot-Przeczek *et al*, 2012).

Con respecto a su localización, HO-1 se encuentra anclada al retículo endoplasmático liso por medio de un fragmento transmembrana ubicado en su extremo c-terminal. Se ha postulado que el clivaje de dicho fragmento genera la pérdida de su función enzimática, pero permite su translocación al núcleo (Mascaró *et al*, 2021).

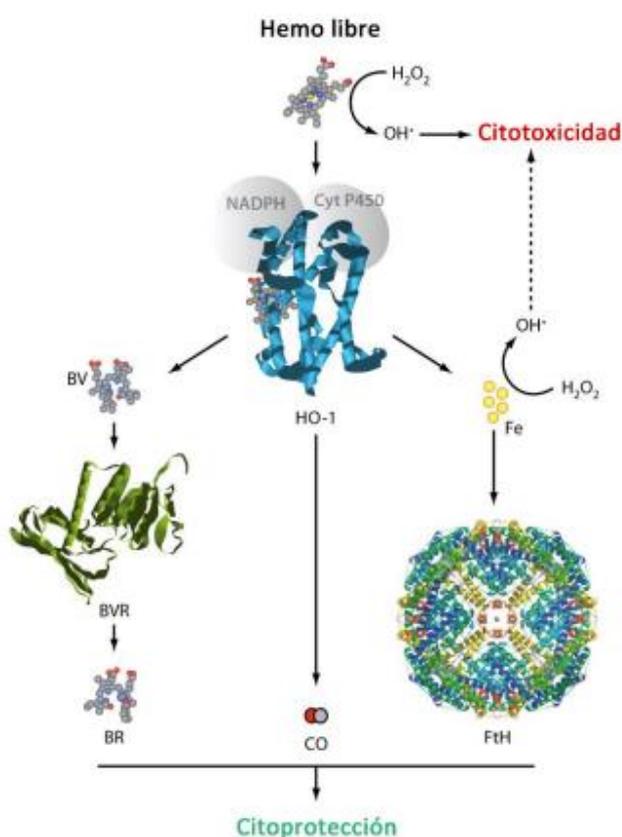


Figura 6. Eje hemo-HO-1. El hemo libre posee efectos citotóxicos como citoprotectores. Mientras que la formación del radical hidroxilo producido por la oxidación del peróxido de hidrógeno ejerce un rol citotóxico, los productos de degradación del hemo por acción de HO-1 poseen un efecto citoprotector. La eliminación del hemo libre implica la ruptura del anillo de protoporfirina IX con la producción de biliverdina (BV), convertida a bilirrubina (BR) por la biliverdina reductasa (BVR); CO y Fe, captado rápidamente por la cadena pesada de la ferritina (FtH). Figura adaptada (Gozzelino *et al*, 2010).

Hemo oxigenasa 1 en distintas patologías

Se ha demostrado que HO-1 posee un rol protector en diferentes modelos de enfermedades inflamatorias, tanto *in vivo* como *in vitro* (Vericat, 2009). En particular, la inflamación crónica en los tejidos es un conocido factor de riesgo para el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, por esta razón diversos estudios se han enfocado en el estudio del rol de HO-1 en el contexto tumoral (Mascaró *et al*, 2021). Se sugiere que el rol de HO-1 depende no sólo del origen del tumor sino también de sus niveles de expresión y su localización subcelular (Mascaró *et al*, 2021). Nuestro grupo de investigación se dedica al estudio de la función de HO-1 en cáncer de próstata, donde demostramos que HO-1 posee un rol antitumoral. Además, describimos por primera vez la localización nuclear de HO-1 en muestras de carcinomas humanos y de hiperplasias benignas (Sacca *et al*, 2007), destacando el rol nuclear de HO-1 más allá de su función enzimática clásica. A su vez, demostramos que tanto la inducción farmacológica como genética de HO-1, induce su translocación al núcleo e inhibe la proliferación, migración e invasión *in vitro* y disminuye el crecimiento tumoral *in vivo* al modular los procesos de invasión y angiogénesis (Gueron *et al*, 2009) y que HO-1 interfiere la señalización de STAT3, modulando negativamente la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (Elguero *et al*, 2017). Por otra parte, en cáncer de mama, otros grupos de investigación han sugerido que HO-1 ejerce efectos antitumorales, asociando su sobreexpresión con el arresto del ciclo celular, apoptosis y disminución de la migración e invasión celular (Gandini *et al*, 2019). En modelos de hepatocarcinoma, también se ha demostrado que HO-1 inhibe la proliferación celular y la metástasis (Zou *et al*, 2016). Sin embargo, también se ha relacionado a HO-1 con funciones protumorales. Por ejemplo, en gliomas y en cáncer de pulmón, HO-1 se asocia con una mayor agresividad (Gandini *et al*, 2014; Hsu *et al*, 2015).

Por otro lado, diversos estudios han reportado que HO-1 puede ejercer una actividad antiviral contra una amplia variedad de virus. En infecciones por Influenza se ha demostrado que la inducción de HO-1 media la interacción con IRF3 promoviendo su fosforilación y posterior translocación al núcleo, induciendo así la expresión de ISGs que inhiben la replicación viral (Ma *et al*, 2019). Se ha demostrado que la inducción o sobreexpresión exógena de HO-1 inhibe la replicación del virus del Dengue y que dicho efecto es mediado por la biliverdina, un producto de la reacción de HO-1, que inhibe a las proteasas que permiten la maduración del poli mRNA. Además, se ha asociado la inducción de HO-1 con un aumento de la respuesta de

IFN-I que es suprimida por el virus del Dengue (Ma *et al*, 2019). Por otro lado, se ha demostrado que HO-1 afecta a las proteasas del virus del Zika inhibiendo su replicación (El Kalamouni *et al*, 2019). En particular, durante la infección por el virus de la Hepatitis B, se ha demostrado que la inducción de HO-1 reprime la replicación viral (Protzer *et al*, 2007). Durante la infección por el virus del Ébola se observó que, luego de la inducción de HO-1 por medio de protoporfirinas, disminuye notablemente la replicación del virus (Hill-Batorski *et al*, 2013). Por último, en infecciones por VIH, también se ha relacionado la acción de HO-1 con una merma en la replicación viral (Cueno *et al*, 2012) (**Figura 7**).

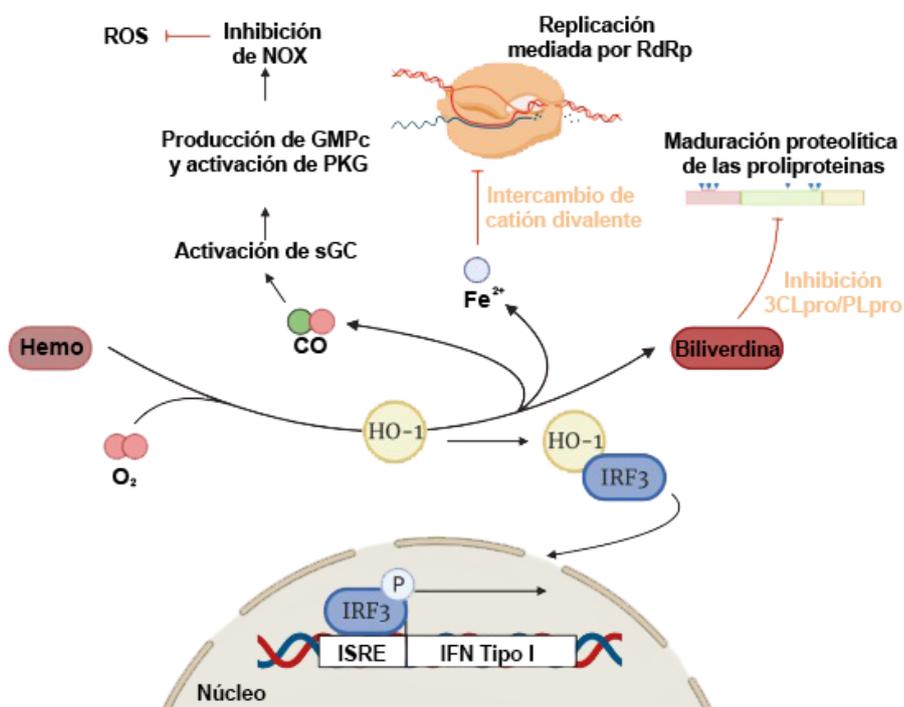


Figura 7. Actividad antiviral de HO-1. HO-1 cataliza la degradación del hemo en monóxido de carbono (CO), Fe²⁺ y biliverdina. Se espera que el Fe²⁺ libre interaccione con la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). El monóxido de carbono activa la guanilil ciclasa soluble (sGC) para generar cGMP, activando así la proteína quinasa G (PKG), que inhibe las NADPH oxidasas (NOX), evitando un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Al inhibir las proteasas 3CLpro y PLpro del SARS-CoV-2, se espera que la biliverdina suprima la maduración proteolítica de los polipéptidos virales. La heterodimerización de HO-1 con IRF3 facilita la fosforilación y translocación nuclear de IRF3 y la posterior inducción de la expresión de los genes de IFN de tipo I. Figura adaptada (Cuadrado *et al*, 2020)

Otra enfermedad donde HO-1 tiene un rol preponderante es en las porfirias. Las porfirias son enfermedades que resultan de alteraciones genéticas o adquiridas en enzimas que participan en la biosíntesis del grupo hemo (Elder *et al*, 1997). En estos casos, una estrategia ampliamente utilizada es la administración de hemo para inhibir la síntesis de porfirinas (Anderson y Collins,

2006). En particular, como tratamiento contra las porfirias se utiliza la hemina, una droga aprobada en Argentina por la Asociación Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y en Estados Unidos por la *Food and Drug Administration* (FDA). La hemina consiste en la protoporfirina IX formando un complejo de coordinación con Fe^{3+} , presentando así una leve diferencia con el grupo hemo, el cual forma complejo con el Fe^{2+} (Del Valle Pérez *et al*, 2002).

Reposicionamiento de drogas para tratamiento de COVID 19

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso que requiere mucho tiempo y de una gran inversión. Frente a la necesidad urgente de fármacos que permitan frenar la cadena de contagios de COVID-19, el reposicionamiento de drogas resulta ser una estrategia muy valiosa. Dicha estrategia consiste en encontrar nuevos blancos para drogas ya existentes debido a que los fármacos suelen presentar diferentes blancos y muchas enfermedades comparten vías moleculares. De esta manera, una droga puede estar involucrada en tratamientos para distintas enfermedades (Hodo *et al*, 2016). A su vez, esta estrategia es más eficiente, ya que se acorta el tiempo de producción (Wong *et al*, 2014), y más económica, ya que se utiliza aproximadamente el diez por ciento del gasto que sería utilizado en el desarrollo de un fármaco tradicional (Deotarse *et al*, 2015). Por último, sus potenciales riesgos ya fueron evaluados en todas las fases de ensayos clínicos para la indicación que fue asignada en un principio (Ashburn y Thor, 2004). Las estrategias tradicionales de desarrollo de medicamentos generalmente incluyen cinco etapas: descubrimiento y preclínico, revisión de seguridad, investigación clínica, revisión de la FDA y monitoreo de seguridad posterior a la comercialización. Sin embargo, solo hay cuatro pasos en el reposicionamiento de drogas: identificación de compuestos, adquisición de compuestos, desarrollo y monitoreo de seguridad posterior a la comercialización de la FDA (Xue *et al*, 2018) (**Figura 8**).



Figura 8. Contraste del proceso de desarrollo de fármacos tradicionales contra el reposicionamiento de drogas. a) Diagrama del proceso de desarrollo de fármacos tradicionales. **b)** Diagrama del reposicionamiento de fármacos. Figura Adaptada (Xue *et al*, 2018)

Es por ello que, en este contexto, el reposicionamiento de drogas surge como una medida efectiva para combatir al SARS-CoV-2. Para septiembre del 2021 se han registrado 1312 estudios de intervención relacionados con COVID-19 (<https://clinicaltrials.gov/>). Dentro de estos estudios se encuentran drogas como remdesivir, un fármaco que se desarrolló contra el virus del Ébola. El remdesivir ha mostrado una potente actividad *in vitro* contra el SARS-CoV-2 (Wang *et al*, 2020) y fue el primer medicamento antiviral aprobado por la FDA para el tratamiento de la COVID-19 (Rubin *et al*, 2020). Por otro lado, la cloroquina y la hidroxicloroquina, ambos agentes antipalúdicos con actividades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras, han demostrado una gran actividad inhibitoria frente al SARS-CoV-2 (Sanders *et al*, 2020). A su vez, se encuentra en estudio la terapia combinada de lopinavir/ritonavir, sugiriendo que la combinación de ambas drogas podría bloquear a la proteasa principal del SARS-CoV e inhibir la replicación viral (Ratia *et al*, 2008). Como se ha mencionado previamente, HO-1 posee un rol antiviral contra una amplia variedad

de virus. Resulta interesante entonces plantear la sobreexpresión de HO-1 como un posible tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 utilizando hemina, droga previamente aprobada por el ANMAT y la FDA para el tratamiento de las porfirias (Anderson *et al*, 2005).

Por otro lado, la ivermectina (IVM) es una droga antiparasitaria de uso veterinario, también aprobada por el ANMAT y la FDA para su uso terapéutico en humanos. A su vez, la IVM recientemente fue aprobada como tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 (Figura 9).

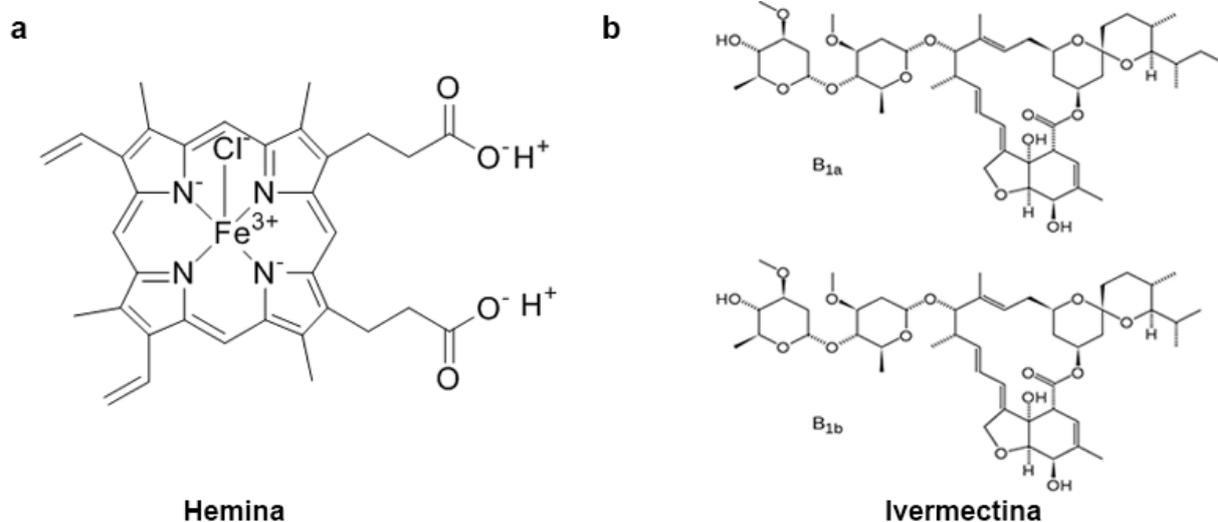


Figura 9. Estructura química de la hemina y la IVM a) La hemina es una protoporfirina IX con un átomo de Fe^{3+} . b) La IVM, mezcla de 22, 23-dihidroavermectina B1a y 22, 23-dihidroavermectina B1b es un derivado macrocíclico de la lactona producidas por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*.

Inicialmente, la IVM fue utilizada como tratamiento para varias enfermedades parasitarias en animales (Kumar *et al*, 2020). Años más tarde se aprobó para el tratamiento de la oncocercosis en humanos (Crump y Omura, 2011). Como fármaco antihelmíntico, su mecanismo de acción en invertebrados implica principalmente la apertura de canales de cloruro activados por glutamato y ácido gamma aminobutírico (GABA), lo que conduce a un aumento de la conductancia de los iones cloruro y provoca la posterior parálisis motora en los parásitos (Sharun *et al*, 2020). Sin embargo, en los últimos años, numerosos grupos de investigación han demostrado que la IVM posee una actividad antiviral contra una amplia variedad de virus *in vitro* (Caly *et al*, 2020). En este sentido, se identificó que la IVM actúa como inhibidor de la interacción entre la proteína integrasa (IN) del VIH y el heterodímero $\alpha/\beta 1$ de importina (IMP), responsable de su importación nuclear. De esta manera, la IVM inhibe la importación nuclear de proteínas virales y por lo tanto la replicación del VIH (Wagstaff *et al*, 2012). A su vez, se ha

demostrado que limita la infección por virus de ARN como el virus del Dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la Encefalitis Equina Venezolana e Influenza, y se cree que este efecto está mediado por la dependencia de $IMP\alpha / \beta 1$ durante la infección de estos virus de ARN (Caly *et al*, 2020). Siendo el SARS-CoV-2 un virus de ARN los resultados previos obtenidos sugieren que la actividad inhibidora del transporte nuclear de la IVM puede ser eficaz (Figura 10).

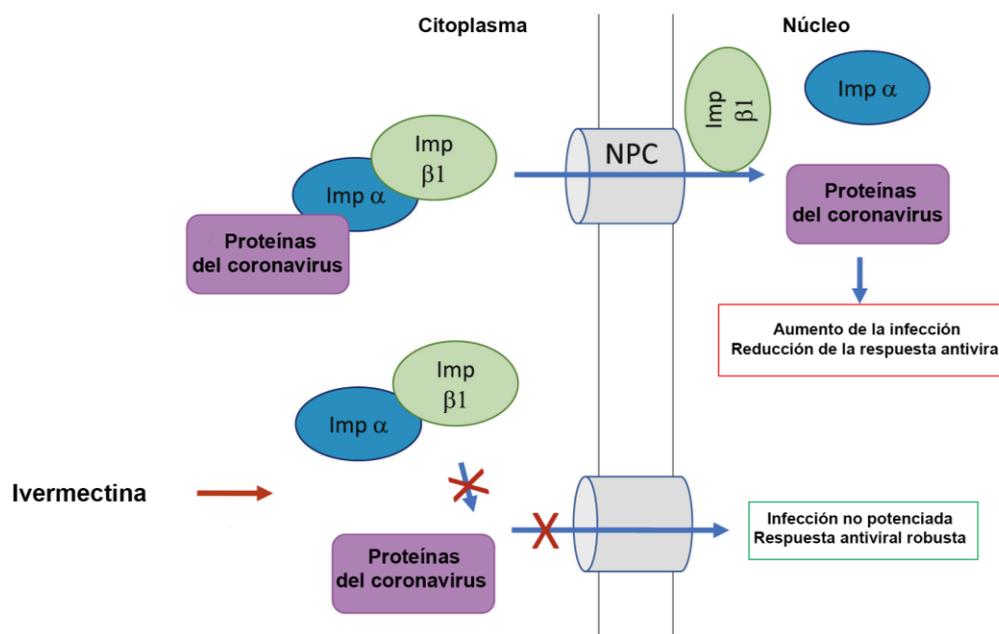


Figura 10. Mecanismo de acción antiviral de la ivermectina. $IMP\alpha / \beta 1$ se une a la proteína de carga de coronavirus en el citoplasma y es trasladada a través del poro nuclear (NPC) al núcleo donde se desensambla el complejo Imp-proteína viral y se reduce la respuesta antiviral de la célula huésped, promoviendo un aumento de la replicación viral. La IVM se une y desestabiliza el heterodímero $IMP\alpha / \beta 1$ evitando así que $IMP\alpha / \beta 1$ se una a la proteína viral, impidiendo su ingreso al núcleo. Figura Adaptada (Caly *et al*, 2020).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Actualmente son muchos los grupos de investigación enfocados en la búsqueda de blancos farmacológicos para contener la infección por SARS-CoV-2. Frente a la necesidad urgente de la existencia de fármacos que permitan frenar la cadena de contagios de COVID-19 una de las estrategias más valiosas es el reposicionamiento de drogas. Bajo esta premisa, en este proyecto nos propusimos combinar drogas previamente aprobadas por el ANMAT que puedan ser utilizadas para potenciar la respuesta inmune frente a infecciones virales. Por un lado, la IVM es una droga antiparasitaria de uso veterinario, también aprobada para su uso terapéutico en humanos. Además de su acción antiparasitaria, numerosos grupos de investigación han demostrado que la IVM posee una actividad antiviral contra una amplia variedad de virus (Caly *et al*, 2020). Por otro lado, la hemina, es una droga aprobada para el tratamiento contra las porfirias, una enfermedad genética causada por el déficit en las enzimas que intervienen en la biosíntesis del grupo hemo (Anderson *et al*, 2005). La expresión de HO-1, la enzima limitante en la degradación del grupo hemo, se induce frente al tratamiento con hemina. A su vez, HO-1 se induce frente a condiciones de estrés celular y a estímulos pro-oxidativos como el aumento de los niveles de ROS, así como también frente a estímulos pro-inflamatorios como citocinas y prostaglandinas (Grochot-Przeczek *et al*, 2012). Diversos estudios han reportado que HO-1 puede ejercer una actividad antiviral contra una amplia variedad de virus como Zika, Ébola, VIH y Hepatitis B, entre otros (El Kalamouli *et al*, 2018; Hill- Batorski *et al*, 2013; Cueno *et al*, 2012; Protzer *et al*, 2007). Estos datos nos llevaron a plantear la hipótesis que *el aumento de la respuesta antiviral del huésped es fundamental para detener la infección por SARS-CoV-2 y dicha respuesta puede potenciarse combinando las drogas IVM y hemina*. Por lo tanto, proponemos que la combinación de las drogas IVM y hemina potenciará tanto la respuesta antiviral como anti-inflamatoria del huésped frente a la infección viral.

Objetivos

En el presente proyecto final se plantea como objetivo general *estudiar la acción antiviral de las drogas IVM y hemina en células epiteliales de pulmón*. Se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Evaluar el efecto de las drogas IVM y hemina sobre:

- a.** La viabilidad celular.
- b.** La expresión de genes relacionados con la infección por SARS-CoV-2, de genes antivirales y de genes anti-inflamatorios.

Objetivo específico 2: Simular un estado de infección viral utilizando Poly inosina:citosina y estudiar el efecto de las drogas IVM y hemina en la expresión de genes relacionados con la infección por SARS-CoV-2, de genes antivirales y de genes anti-inflamatorios.

Para abordar nuestros objetivos, considerando el tropismo del SARS-CoV-2 por el epitelio pulmonar, trabajaremos con la línea celular A549. Las células A549 son células epiteliales alveolares, particularmente neumocitos tipo II, provenientes de un adenocarcinoma alveolar basal humano. Dentro de sus particularidades, dicha línea celular crece como un cultivo en monocapa con un tiempo de duplicación de 48 horas en fase logarítmica y posee una morfología epitelial (Lieber *et al*, 1976).

Metodología

Cultivo celular

La línea celular A549 proveniente de carcinoma de pulmón humano (*Homo sapiens*), gentilmente cedida por el Dr. Bueno (Laboratorio de Virología, IQUIBICEN), fue cultivada con medio de cultivo DMEM (Invitrogen, USA) suplementado con 10% v/v suero fetal bovino (SFB, Internegocios, Argentina), penicilina 100 U/ml (CalbioChem, USA), estreptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) y anfotericina 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA). Las células se cultivaron a 37 °C bajo una concentración de CO₂ del 5%. El mantenimiento celular se realizó repicando las células al alcanzar un 80% de confluencia. Para ello se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS estéril para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero, y luego se agregó 1 ml de tripsina 0,1 mM. Luego, se incubaron las células en una estufa a 37 °C hasta lograr la disociación de las células, se agregó el medio fresco, previamente templado, en el volumen adecuado para realizar los sub-cultivos deseados.

Tratamientos

La solución stock de hemina (Sigma-Aldrich, USA) se preparó disolviendo 36 mg de cloruro de hemina en 0,4 ml de NaOH 0,5 N, 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8. La solución se filtró utilizando filtros de 0,2 µm, se alícuotó y se conservó a -20 °C hasta su uso. Al momento de tratar los cultivos celulares con la droga, se efectuó una dilución 1:100 en PBS estéril, la cual se utilizó luego para obtener la concentración final deseada para cada experimento en DMEM suplementado con 10% v/v SFB y antibióticos. Las células fueron tratadas con 10, 20, 40 y 80 µM de hemina y la duración de los tratamientos fue de 1, 3, 6 y 24 horas. Por otro lado la solución stock de IVM (10 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Argentina) se conservó a -20°C hasta su uso. Al momento de tratar los cultivos celulares con la droga, se efectuó una dilución 1:114 en PBS estéril, la cual se utilizó luego para obtener la concentración final deseada para cada experimento en DMEM suplementado con 10% v/v SFB y antibióticos. Las células fueron tratadas con 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 50, 100 y 150 µM de IVM y la duración de los tratamientos fue de 1, 3, 6 y 24 horas.

Viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 1000 células A549 por pocillo en una placa de 96 wells y se crecieron en 200 µl de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% v/v SFB con antibióticos en estufa a 37°C y CO₂ 5 % durante toda la noche. Luego se realizaron los tratamientos, como se detalla para cada experimento en la sección Resultados. Cada tratamiento se realizó por triplicado. La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo comercial *Cell Titer 96 wells Aqueous non Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, USA) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La solución comercial de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (2 µl) se mezcló con la solución comercial N-metilfenacinametasulfato (PMS) (100 µl) y se conservó en alícuotas a -20°C protegido de la luz. Al momento de cosechar las células se reemplazó el medio de cultivo de las placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de cultivo fresco sin SFB y se agregaron 20 µl de MTS/PMS por pocillo. Como blanco de reacción se utilizaron 3 pocillos sin células con 100 µl de medio de cultivo. Las placas se incubaron 1, 2 y 3 horas en estufa a 37°C con CO₂ 5 %, en oscuridad y se midió la absorbancia a 490 nm en lector de placas *Glomax Multidetecion System* (Promega, USA). La viabilidad celular para cada tratamiento se calculó como el porcentaje de la relación entre el promedio de la absorbancia de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

Extracción de ARN

Para la purificación de ARN total se utilizó el reactivo Quick-Zol (Kalium technologies, Argentina) como lo detalla el fabricante con algunas modificaciones. Las células se sembraron en placas multipocillos de 6 y se realizaron los tratamientos correspondientes de acuerdo a cada experimento. Al momento de cosechar las células se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS. Luego, se recolectaron las células utilizando una espátula y 250 µl de Quick-Zol; la suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se añadieron 50 µl de cloroformo, se mezcló enérgicamente con vortex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Para acelerar la separación de fases se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa superior, que contiene el ARN, se transfirió a un nuevo tubo. El ARN se precipitó con 125 µl de isopropanol por cada 250 µl de Quick-Zol incubando a -20°C durante

40 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó a 7500 rpm a 4°C durante 5 minutos y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 50°C durante 3 minutos, se resuspendió en 30 µl de H₂O libre de RNasas y se rehidrató incubando 10 minutos a 60°C. El ARN total extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en reacciones de transcripción reversa.

Cuantificación del ARN

La concentración del ARN total obtenido se midió mediante absorbancia a 260 y 280 nm utilizando un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Si la concentración del ARN era mayor a 1 µg/µl con una pureza (A260/A280) mayor a 1,7 se procedió a la retrotranscripción para la obtención del ADN copia (ADNc).

Preparación del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total mediante la transcripción reversa o retrotranscripción utilizando el kit *RevertAid RT* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron 1-2 µg de ARN total con Oligo dT y H₂O libre de RNasas hasta un volumen final de 12 µl. Se desnaturalizaron las muestras a 65°C durante 5 minutos. Luego se agregó la mezcla de reacción obteniendo así una solución final con buffer de reacción 1X, dNTPs 0,5 mM, inhibidores de RNasas 1 U/µl y transcriptasa reversa 10 U/µl. Se incubó durante 60 minutos a 42°C. La reacción se inactivó a 70°C durante 5 minutos. El ADNc obtenido se utilizó en reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) o se conservó a -20°C. Como control se realizó el mismo protocolo, pero sin el agregado de la enzima transcriptasa reversa (Control No RT).

PCR en tiempo real o cuantitativa

El ADNc se amplificó por qPCR utilizando el kit *FastStart Universal Probe Master* (Roche, Suiza). Se amplificaron 1,8 µl de una dilución 1:30 del ADNc obtenido en la RT en la mezcla de reacción junto con los primers específicos (0,2 µM, Integrated DNA Technologies Inc., USA) en un volumen final de 15 µl. Se relativizó la expresión del gen de interés a un gen

de referencia utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se empleó, como gen de referencia se empleó ciclofilina A (*PPIA*).

Los primers utilizados (**Tabla 1**) se diseñaron con la herramienta web *Primer Blast* (NCBI, USA) y se testearon con el *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>). Para encontrar la temperatura de annealing óptima se realizaron PCR a tiempo final a diferentes temperaturas dentro del rango teórico de los primers. Una vez definida la temperatura de annealing óptima se evaluó la expresión de dichos genes mediante qPCR.

TABLA 1. Detalle de los primers utilizados.

Gen		Secuencia	Amplicón	T annealing
<i>ADAM17</i>	Fw	CTACAGATACATGGGCAGAGGG	167	57°
	Rv	TGTGGAGACTTGAGAATGCGA		
<i>BSG/CD147</i>	Fw	CAGAACACATCAACGAGGGGG	157	56°
	Rv	TGCGAGGAACTCACGAAGAA		
<i>CTSB</i>	Fw	CTACAGCCCGACCTACAAACA	136	60°
	Rv	GAAGTCCGAATACACAGAGAAA		
<i>CTSL</i>	Fw	TATGCTTTCAGTATGTTTCAGG	126	60°
	Rv	CACAAAGCCGGTGTTCATTAG		
<i>HIF1A</i>	Fw	GGAACCTGATGCTTTAACTTTG	156	58°
	Rv	TGTAATTTTTCGTTGGGTGAGG		
<i>HMOX1</i>	Fw	ACTGCGTTCCTGCTCAACAT	134	60°
	Rv	GGGCAGAATCTTGCACTTT		
<i>IFNA1</i>	Fw	CTTGTGCCTGGGAGGTTGTC	194	59°
	Rv	TGGTCATAGTTATAGCAGGGGT		
<i>IRF3</i>	Fw	TCTGGTTCTGTGTGGGGGAGT	170	61°
	Rv	TGGGTGGCTGTTGGAAATGTG		
<i>MX1</i>	Fw	AGATGCCCGCTGGTGCTGAA	166	60°
	Rv	GACTGATTCCCATTCTTCCCC		
<i>NFKB1</i>	Fw	ACTCGCCACCCGGCTTCAGA	148	60°
	Rv	GGCCATCTGCTGTTGGCAGT		
<i>NRF2</i>	Fw	AACCAGTGGATCTGCCAACTACTC	182	61°
	Rv	AGACTGGGCTCTCGATGTGA		
<i>PPIA</i>	Fw	GGTATAAAAGGGGCGGGAGG	156	60°
	Rv	CTGCAAACAGCTCAAAGGAGAC		

Tratamiento con Poly inosina:citosina

El tratamiento con Poly inosina:citosina (Poly (I:C)) HMW (InvivoGen, USA) se realizó mediante transfección con lipofectamina LTX (Invitrogen, USA) en una concentración final de 10 µg/ml. El tratamiento se realizó en placas de 6 pocillos donde se plaquearon 200000 células. Al día siguiente cuando se alcanzó una confluencia celular del 60 a 80% se les extrajo el medio y se preparó la solución para realizar la transfección. Se diluyó el Poly (I:C) en DMEM sin SFB ni antibióticos y se agregó la lipofectamina. Dicha mezcla se incubó durante 30 minutos

a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 500 μ l de la mezcla y se llevó a un volumen final de 2 ml con DMEM sin SFB ni antibióticos. Luego de 6 horas de incubación en estufa a 37°C con atmósfera de CO₂ 5%, se retiró el medio y se agregó DMEM 10% SFB y se trataron las células con hemina, IVM o ambas drogas. Pasadas las 24 horas se procedió a la extracción del ARN.

Análisis estadístico

El software GraphPad Prism fue utilizado para el análisis estadístico de los datos. Todos los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar de al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de hipótesis de análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey con un umbral de $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****).

Resultados

Establecimiento de las concentraciones óptimas de hemina e ivermectina.

Comenzamos estudiando el efecto del tratamiento con hemina e IVM en la línea celular A549 de epitelio pulmonar humano. Con el objetivo de establecer las condiciones a utilizar de dichas drogas, evaluamos si los tratamientos afectaban la viabilidad celular. Para ello, se trataron las células con concentraciones crecientes de los compuestos durante 24 horas. En primer lugar, realizamos tratamientos de 24 horas ya que es el tiempo que tenemos pre establecido en nuestros modelos de laboratorio (Ortiz *et al*, 2020). Por otro lado, el rango de concentraciones utilizado para hemina fue de 10 a 80 μM , concentraciones que previamente también fueron evaluadas en nuestro laboratorio (Jaworski *et al*, 2017). En el caso de la IVM se utilizaron concentraciones de 0,1 a 150 μM previamente validadas por otros grupos de investigación (Lespine *et al*, 2006; King *et al*, 2020) (**Figura 11**).

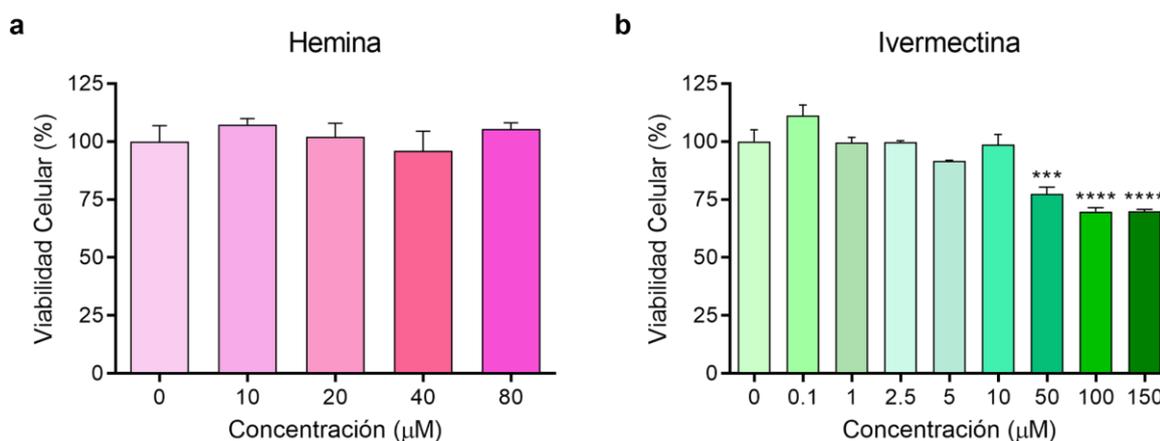


Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular en presencia de hemina e IVM. Ensayo de viabilidad celular realizado en células A549 tratadas con hemina (0-80 μM) (a) e IVM (0-150 μM) (b) durante 24 horas. $p=0,0002$ (***) y $p<0,0001$ (****) con respecto al control.

Con respecto al tratamiento con hemina no se observó un efecto de la droga sobre la viabilidad celular para ninguna de las diferentes dosis administradas, indicando que cualquiera de las concentraciones evaluadas podría ser utilizada. Por otra parte, el tratamiento con concentraciones de 0,1 μM a 10 μM de IVM no afecta la viabilidad celular, sin embargo, frente a concentraciones más altas (50 μM , 100 μM y 150 μM) hay una disminución significativa de

la viabilidad celular. Así, concluimos que él es recomendable el uso de IVM en sus dosis más bajas (rango de 0,1 μM a 10 μM).

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, la vía de IFN-I se activa frente a la infección viral, induciendo genes de respuesta antiviral e inmunomoduladores que son esenciales para contener y combatir las infecciones (Thompson *et al*, 2011b). Uno de ellos es *MXI*, que codifica para la proteína MX1, que se encuentra asociada a la respuesta antiviral de una gran diversidad de virus y su acción reside en la inhibición del transporte de las nucleocápsides virales (Haller *et al*, 2007). Por otro lado, como también ya fue mencionado, la infección por SARS-CoV-2 se caracteriza por un estado de inflamación generalizada (Del Rio *et al*, 2020). De esta manera, lograr un aumento de genes antivirales y/o anti-inflamatorios representaría una buena estrategia para contener la infección. Por este motivo, para encontrar las dosis óptimas de hemina e IVM, nos focalizamos en el efecto de dichas drogas sobre la expresión de *MXI* y *HMOXI* en células tratadas con las concentraciones de hemina e IVM evaluadas previamente. Particularmente, para el tratamiento con IVM se descartó el análisis de las concentraciones altas (50 μM , 100 μM y 150 μM) debido a la disminución significativa que producen en la viabilidad celular.

En primer lugar, evaluamos el efecto del tratamiento con hemina sobre la expresión de *HMOXI*. Se observa que la expresión de *HMOXI* aumenta como consecuencia del tratamiento durante 24 horas con hemina. En particular, la concentración de 80 μM genera un aumento aproximado de 4 veces con respecto al control ($p < 0,0001$) (**Figura 12.a**). Luego, se estudió si el tratamiento con hemina modificaba la expresión de *MXI*. Encontramos que las concentraciones de 10 μM , 20 μM y 40 μM de hemina generan una disminución significativa de los niveles de *MXI* ($p < 0,05$) mientras que con la concentración de 80 μM de hemina no se observan diferencias significativas en cuanto a la expresión basal de *MXI* (**Figura 12.b**). Basándonos en dichos resultados, seleccionamos la dosis de 80 μM de hemina para futuros experimentos ya que la expresión de *HMOXI* presenta el mayor porcentaje de aumento y la expresión de *MXI* no se modifica.

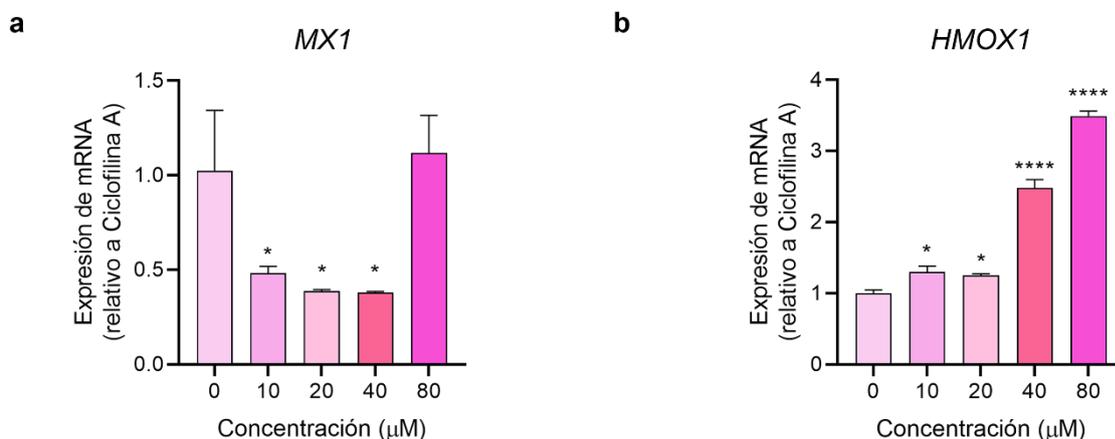


Figura 12. Análisis de la expresión de *HMOX1* y *MX1* en células tratadas con hemina. Se evaluó mediante RT-qPCR la expresión del gen *HMOX1* (a) y *MX1* (b) en células A549 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de hemina (0-80 μM) durante 24 horas. $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

En segundo lugar, estudiamos el efecto del tratamiento con distintas dosis de IVM sobre la expresión de *MX1* y *HMOX1*. Si bien las concentraciones bajas de IVM no modifican la expresión de *MX1*, encontramos que el tratamiento con la concentración de 10 μM genera un marcado incremento de los niveles de *MX1* ($p < 0,0001$) (Figura 13.a). Por otro lado, cuando evaluamos la expresión de *HMOX1* en células A549 tratadas con IVM, sólo se observó un aumento significativo con el tratamiento de 10 μM ($p < 0,05$) (Figura 13.b).

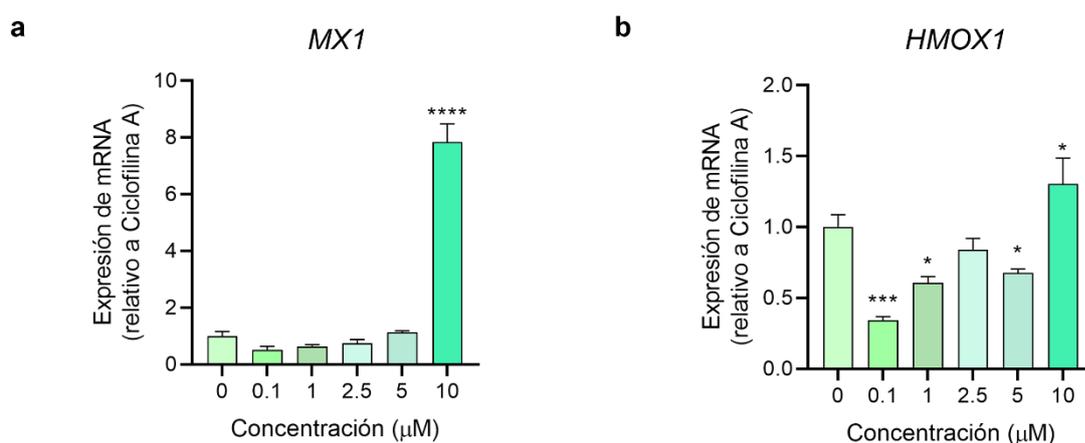


Figura 13. Análisis de la expresión de *HMOX1* y *MX1* en células tratadas con IVM. Se evaluó mediante RT-qPCR la expresión del gen *MX1* (a) y *HMOX1* (b) en células A549 tratadas con diferentes concentraciones de IVM (0-10 μM) durante 24 horas. $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

Una vez que establecimos las concentraciones óptimas a emplear de ambas drogas (10 μ M de IVM y 80 μ M de hemina) continuamos evaluando el efecto de la combinación de ambas drogas sobre la viabilidad celular. Aprovechamos este punto para incorporar el estudio de diferentes tiempos de tratamiento: 1, 3, 6 y 24 horas. Como puede observarse, los tiempos de tratamiento más cortos con IVM no afectan la viabilidad celular. A su vez, combinar el tratamiento con hemina, tampoco genera cambios estadísticamente significativos en dicho parámetro (**Figura 14**).

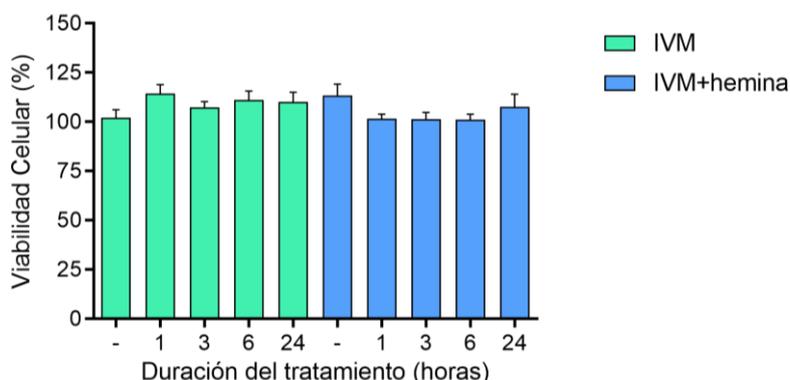


Figura 14. Efecto del tratamiento combinando las drogas hemina e IVM sobre la viabilidad celular. Se realizó un ensayo de viabilidad celular con 10 μ M de IVM o en combinación con 80 μ M hemina a distintos tiempos (1, 3, 6 y 24 horas).

Efecto del tratamiento con hemina e IVM sobre la expresión de genes antivirales y anti-inflamatorios

Una vez establecidas las concentraciones óptimas de hemina e IVM, nos propusimos evaluar el efecto de dichas drogas, solas o en combinación, sobre la expresión de distintos genes relacionados con la infección viral por SARS-CoV-2, así como también de genes antivirales y anti-inflamatorios. Para abordar dicho objetivo, células A549 se cultivaron con hemina, IVM o la combinación de ambas drogas a diferentes tiempos y se evaluó por RT-qPCR la expresión de los genes de interés. En primer lugar, analizamos el efecto de las drogas sobre el gen *MXI*. Anteriormente demostramos que el tratamiento con 10 μ M de IVM durante 24 horas aumenta los niveles de expresión de *MXI* (**Figura 13.a**). En este punto, corroboramos el efecto de inducción de *MXI* por el tratamiento con IVM ($p < 0,0001$). A su vez, observamos nuevamente

que el tratamiento con 80 μ M de hemina durante 24 horas no tiene efecto sobre la expresión de *MX1*. Por otra parte, la combinación de ambas drogas aumenta la expresión de *MX1* ($p < 0,0001$) (Figura 15).

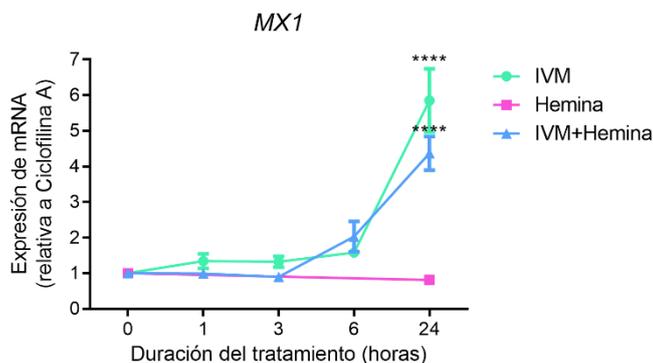


Figura 15. Análisis de la expresión de *MX1* en células A549 tratadas con hemina, IVM o la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *MX1* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 horas). $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

En segundo lugar, evaluamos el efecto de las drogas sobre la expresión de *HMOX1* y corroboramos que su expresión aumenta como consecuencia del tratamiento con 80 μ M de hemina durante 24 horas ($p < 0,0001$). A su vez, nos resultó de sumo interés observar que la combinación de la hemina con la IVM potencia el efecto de inducción de hemina sobre la expresión de *HMOX1* ($p < 0,0001$), sugiriendo que la respuesta anti-inflamatoria mediada por HO-1 puede potenciarse al combinar ambas drogas (Figura 16.a). A su vez, incorporamos en nuestro análisis a NRF2, el principal factor de transcripción de *HMOX1* (Loboda *et al*, 2016). Encontramos que los tratamientos por separado con IVM y hemina disminuyen la expresión de NRF2 ($p < 0,0001$) sin embargo, la combinatoria de las drogas IVM y hemina produce un aumento en la significativo en su expresión ($p < 0,0001$) (Figura 16.b).

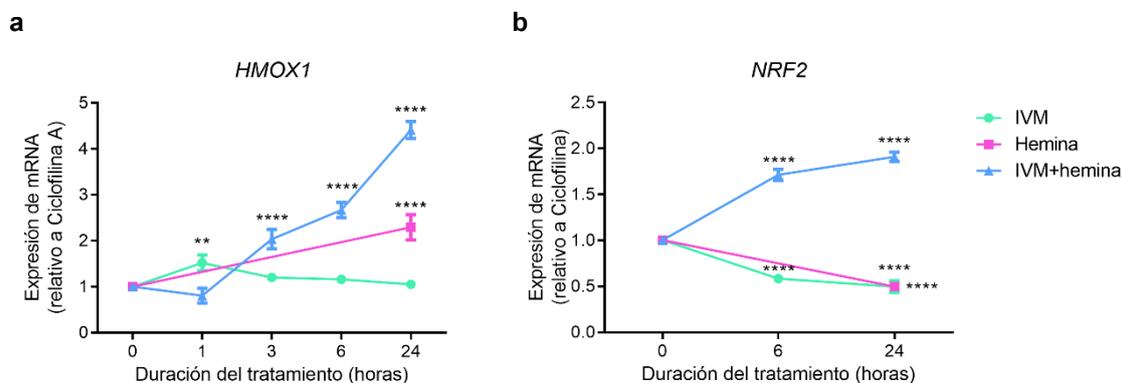


Figura 16. Expresión de los genes *HMOX1* y *NRF2* en células A549 luego del tratamiento con IVM, hemina y la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HMOX1* (a) y *NRF2* (b) luego del tratamiento con ivermectina (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (6 y 24 horas). $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

Luego, dada la relevancia de la vía de IFN-I en la respuesta antiviral (Iliev *et al*, 2011), continuamos nuestro análisis centrándonos en IRF3, un factor de transcripción que regula la expresión de los ISGs (Zabetakis *et al*, 2020). Analizamos la expresión de *IRF3* por RT-qPCR y encontramos que los tratamientos de las drogas individuales, hemina e IVM, generan una disminución en la expresión ($p < 0,0001$). Sin embargo, el tratamiento combinado de hemina con IVM aumenta la expresión de *IRF3*, tanto a las 6 como a las 24 horas ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente) (Figura 17), evidenciando que la vía de IFN-I es estimulada por el tratamiento combinado con IVM y hemina.

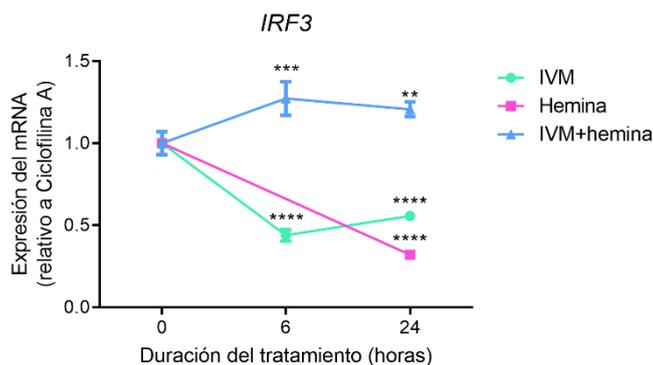


Figura 17. Expresión de *IRF3* en células A549 luego del tratamiento con IVM, hemina y la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *IRF3* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (6 y 24 horas). $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

Continuamos estudiando distintos genes que codifican proteínas que están relacionadas con la entrada del virus a la célula huésped. Así, analizamos la expresión de *BSG*, un receptor de membrana que facilita la entrada del SARS-CoV-2 (Wang *et al*, 2020) y *ADAM17*, una proteasa que compite con TMPRSS2 y cuya actividad se relaciona con la inhibición del ingreso del virus a la célula huésped (Palau *et al*, 2020). Encontramos que tanto la IVM como la hemina disminuyen la expresión de *BSG*, tanto en los tratamientos de 6 como de 24 horas ($p < 0,001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). Sin embargo, la combinatoria de ambas drogas aumenta la expresión de *BSG* ($p < 0,01$) (**Figura 18.a**). Por otra parte, encontramos que el tratamiento combinando ambas drogas también genera un aumento en la expresión de *ADAM17* ($p < 0,001$). El tratamiento con IVM tiene un efecto de inducción sobre *ADAM17* únicamente a las 6 horas ($p < 0,0001$), mientras que el tratamiento con hemina no modifica su expresión (**Figura 18.b**).

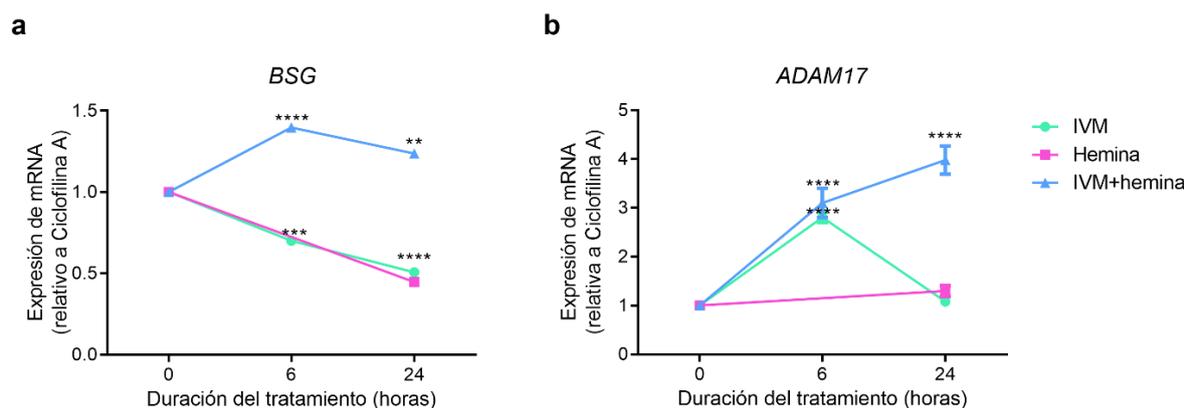


Figura 18. Expresión de los genes *BSG* y *ADAM17* en células A549 tratadas con hemina, IVM o la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *BSG* (a) y *ADAM17* (b) luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (6 y 24 horas). $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

Luego, estudiamos la expresión de *CTSB* y *CTSL*, dos proteasas capaces de activar a la proteína viral S, permitiendo el ingreso del SARS-CoV-2 a la célula huésped (Jaimes *et al*, 2020). Encontramos que el tratamiento con IVM a 6 horas genera un aumento de la expresión de *CTSB* ($p < 0,05$) y que la combinación de las drogas potencia dicho aumento ($p < 0,0001$) (**Figura 19.a**). Por otra parte, analizamos el efecto del tratamiento con IVM y hemina sobre la expresión de *CTSL* y observamos que su expresión aumenta significativamente como consecuencia del tratamiento con IVM durante 24 horas ($p < 0,001$). El tratamiento con hemina

no modula los niveles de expresión de *CTSL*, sin embargo, potencia el efecto observado con IVM tanto a las 6 como a las 24 horas de tratamiento ($p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente) (**Figura 19.b**).

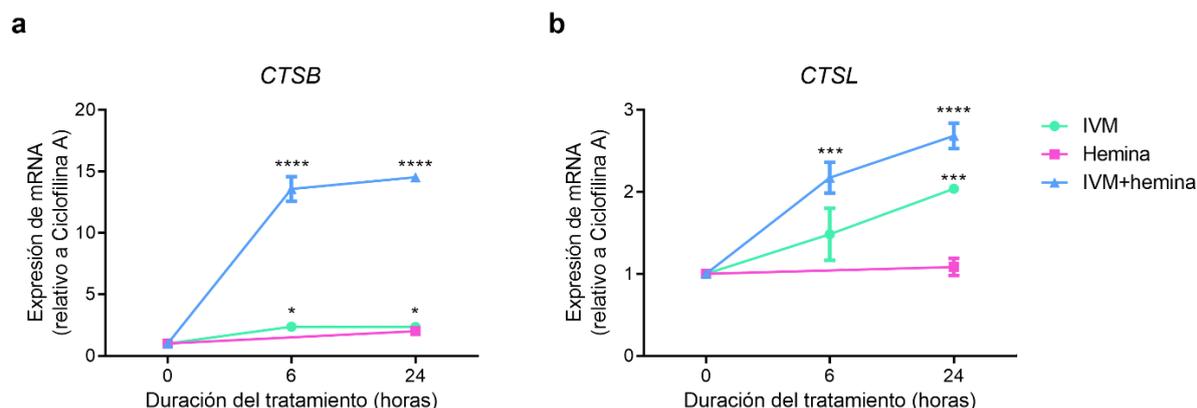


Figura 19. Análisis de la expresión de *CT SB* y *CT SL* en células A549 luego del tratamiento con IVM, hemina y la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *CT SB* (a) y *CT SL* (b) luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (6 y 24 horas). $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***) $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

Continuamos con en el estudio de la expresión del Factor Inducible por Hipoxia 1 α (HIF-1 α) codificado por el gen *HIF1A*. HIF-1 α posee un rol fundamental en la respuesta a los bajos niveles oxígeno y se encarga de regular la expresión de una gran variedad de genes, cuyos productos participan en procesos como la angiogénesis, el metabolismo energético, la eritropoyesis y la proliferación celular (Marín-Hernández 2009). HIF-1 α es de sumo interés en el contexto de infección por SARS-CoV-2 ya que disminuye los niveles tanto de ACE2 como de TMPRSS2, y genera un aumento en la expresión de *ADAMI7* (Serebrovska *et al*, 2020). El tratamiento con hemina o IVM no genera diferencias significativas en la expresión de *HIF1A* con respecto al control. Sin embargo, la combinación de ambas drogas genera un aumento significativo en la expresión de *HIF1A*, tanto a las 6 como a las 24 horas de tratamiento ($p < 0,001$ y $p < 0,0001$, respectivamente) (**Figura 20**).

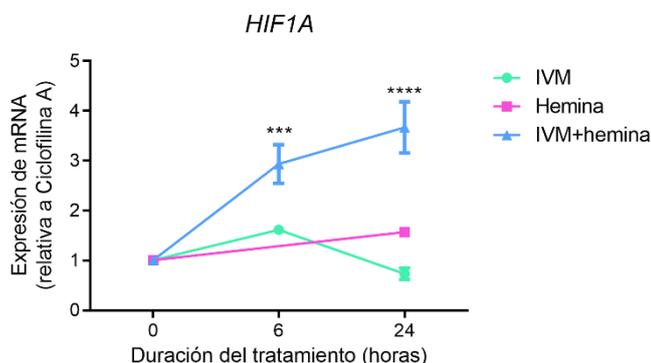


Figura 20. Expresión de *HIF1A* en células A549 luego del tratamiento con IVM, hemina y la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HIF1A* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (6 y 24 horas). $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

En último lugar, analizamos la expresión del gen *HSPB1* que codifica para la proteína HSP27 (del inglés *Heat Shock Protein 27*). HSP27 es un miembro de la familia de las proteínas pequeñas de choque térmico que se conoce principalmente por su función clásica de chaperona, sin embargo, también se caracteriza por sus funciones anti-inflamatorias (Batulan *et al*, 2016; O’Brien y Sandhu, 2020; Inia y O’Brien, 2021). Encontramos que luego del tratamiento con IVM durante 6 horas se reduce significativamente la expresión de *HSPB1* ($p < 0,001$). Sin embargo, a las 24 horas de tratamiento, no se observan diferencias respecto al control. Por otro lado, el tratamiento con hemina reduce la expresión de *HSPB1* ($p < 0,0001$). Por último, al analizar el efecto de la combinación de ambas drogas, encontramos que el tratamiento durante 24 horas produce un aumento significativo en la expresión de *HSPB1* ($p < 0,01$) (**Figura 21**).

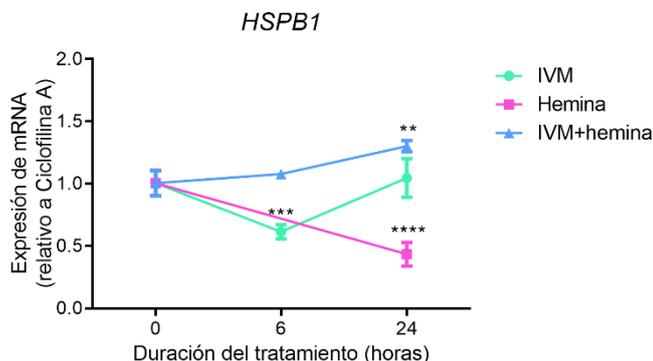


Figura 21. Expresión de *HSPB1* en células A549 luego del tratamiento con IVM, hemina y la combinación de ambas drogas. Se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HSPB1* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas a diferentes tiempos (6 y 24 horas). $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****) con respecto al control.

Evaluación del efecto del tratamiento con hemina, IVM y la combinación de ambas drogas sobre la expresión de genes antivirales y anti-inflamatorios durante la simulación de un estado de infección viral

Basándonos en los resultados mencionados en el apartado anterior, nos resultó de gran interés evaluar el efecto de las drogas IVM y hemina sobre los genes previamente analizados en un contexto de infección viral. Dado que en nuestro laboratorio no contamos con las normas de bioseguridad necesarias para trabajar con partículas virales, optamos por generar un modelo de infección viral mediante el tratamiento con Poly (I:C), un análogo sintético del ARN doble cadena, antagonista del receptor TLR3 (Aznar *et al*, 2019).

En primer lugar, analizamos la expresión *NFKB1*, un factor de transcripción que regula una gran variedad de genes implicados en diferentes procesos de la respuesta inmunitaria e inflamatoria (Liu *et al*, 2019). Encontramos que luego del tratamiento con Poly (I:C), la expresión de *NFKB1* aumenta significativamente ($p < 0,001$), comprobando la sensibilidad de las células A549 al Poly (I:C). Además, el tratamiento con hemina disminuye significativamente la expresión de *NFKB1* con respecto al control con Poly (I:C) ($p < 0,05$). Sin embargo, en presencia de IVM no se observan cambios en la expresión de *NFKB1* (**Figura 22**).

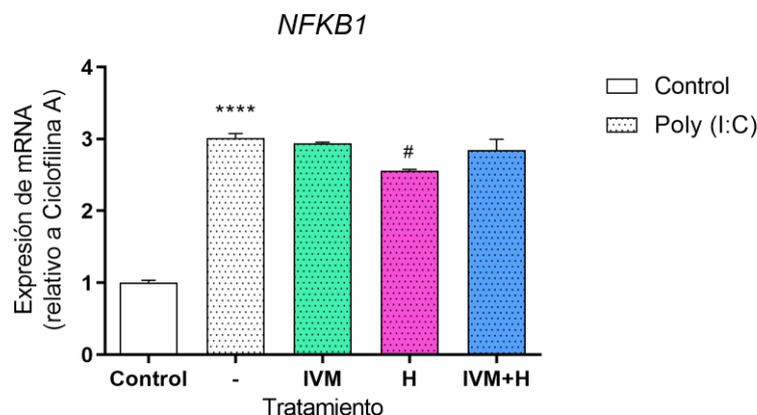


Figura 22. Efecto del tratamiento con las drogas IVM, hemina y su combinación en la expresión de *NFKB1* en células A549 tratadas con Poly (I:C). Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *NFKB1* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,0001$ (****) con respecto al control. $p < 0,05$ (#) con respecto al control con Poly (I:C).

Continuamos analizando la expresión de *IRF3*, un gen que se activa mediante la vía de TLR3. Encontramos que luego del tratamiento con Poly (I:C) la expresión de *IRF3* aumenta significativamente con respecto al control ($p < 0,01$), resultado que confirma la sensibilidad de las células A549 al Poly (I:C). Tanto el tratamiento con las drogas IVM y hemina por separado como la combinatoria de las mismas genera una disminución en la expresión de *IRF3* ($p < 0,01$; $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente) con respecto al control con Poly (I:C) (**Figura 23.a**). Por otro lado, evaluamos la expresión del gen *IFNA1*, uno de los principales IFN-I, que posee actividad antiviral contra un amplio espectro de virus a ARN (Mantlo *et al.*, 2020). Encontramos que el tratamiento con Poly (I:C) no genera cambios significativos en la expresión de *IFNA1*. Por otro lado, los tratamientos con hemina, IVM y la combinación de ambas drogas, tampoco generan cambios en la expresión de *IFNA1* con respecto al control con Poly (I:C) (**Figura 23.b**).

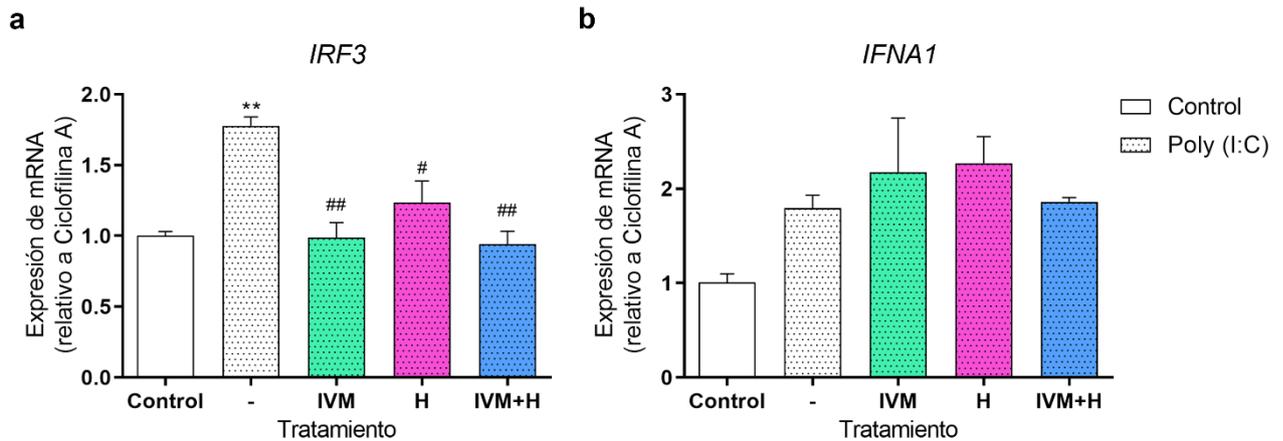


Figura 23. Efecto del tratamiento con las drogas IVM, hemina y su combinación en la expresión de *IRF3* e *IFNA1* en células A549 tratadas con Poly (I:C). Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *IRF3* (a) e *IFNA1* (b) luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,01$ (**) con respecto al control. $p < 0,05$ (#) y $p < 0,01$ (##) con respecto al control con Poly (I:C).

Luego de haber comprobado la sensibilidad de nuestro modelo al tratamiento con Poly (I:C), continuamos estudiando la expresión del gen *MXI*, uno de los principales ISGs (Schoggins y Rice, 2011). Encontramos que el tratamiento con Poly (I:C) genera un aumento significativo en la expresión de *MXI* ($p < 0,05$), sugiriendo que la vía de IFN-I se induce por el tratamiento intracelular con Poly (I:C). Por otro lado, el tratamiento con IVM produce un aumento significativo de la expresión de *MXI* con respecto al control con Poly (I:C) ($p < 0,05$), demostrando la capacidad de la IVM de inducir los niveles de expresión de *MXI*, no solo en un contexto normal sino también durante la simulación de un estado de infección viral. Por último, los tratamientos con hemina o el tratamiento combinando ambas drogas no genera cambios en la expresión de *MXI* con respecto al control con Poly (I:C) (Figura 24).

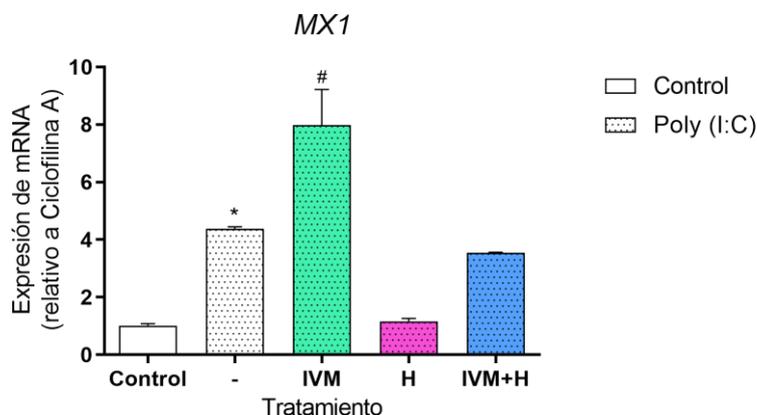


Figura 24. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de *MX1* en células A549 tratadas con Poly (I:C) luego del tratamiento con ivermectina, hemina y su combinación. Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *MX1* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,05$ (*) con respecto al control. $p < 0,05$ (#) con respecto al control con Poly (I:C).

Continuamos nuestro estudio analizando la expresión de *HMOX1* y *NRF2* (**Figura 25**). Particularmente, la expresión de *HMOX1* no se vio afectada por el tratamiento con Poly (I:C), sin embargo, observamos un aumento en su expresión cuando las células fueron tratadas con hemina ($p < 0,01$). Este hallazgo demuestra que la hemina es también capaz de inducir *HMOX1* en este contexto de simulación de una infección viral. Por último, el tratamiento con IVM no altera los niveles de expresión de *HMOX1* (**Figura 25.a**). Con respecto a *NRF2*, encontramos que el tratamiento con Poly (I:C) no modifica su expresión. A su vez, si bien el tratamiento con hemina, solo o combinado con IVM, no modula la expresión de *NRF2*, el tratamiento con IVM aumenta significativamente su expresión ($p < 0,001$), sugiriendo un efecto sinérgico entre ambas drogas sobre esta vía (**Figura 25.b**).

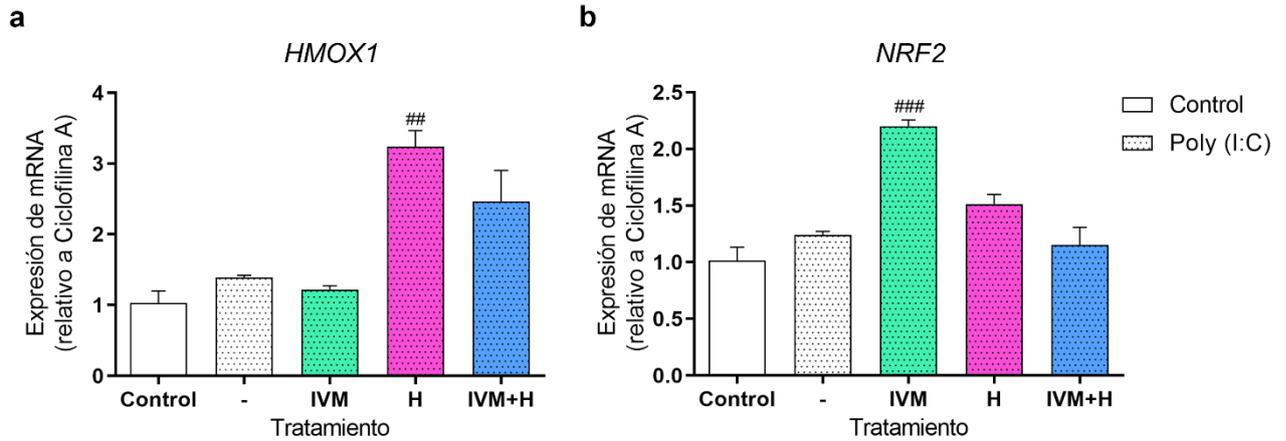


Figura 25. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de *HMOX1* y *NRF2* en células A549 tratadas con Poly (I:C) luego del tratamiento con IVM, hemina su combinación. Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HMOX1* (a) y *NRF2* (b) luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###) con respecto al control con Poly (I:C).

Continuamos analizando la expresión de genes que codifican para proteínas asociadas con la entrada del virus a la célula huésped, como lo son *BSG* y *ADAM17* (Lambert *et al*, 2020; Palau *et al*, 2020; Ulrich y Pillat, 2020). Encontramos que la expresión de ambos genes no se modifica por el tratamiento con Poly (I:C) y, a su vez, los tratamientos con las drogas IVM y hemina, solas o en combinación, tampoco se generan cambios estadísticamente significativos en la expresión de *BSG* (Figura 26.a) y *ADAM17* (Figura 26.b).

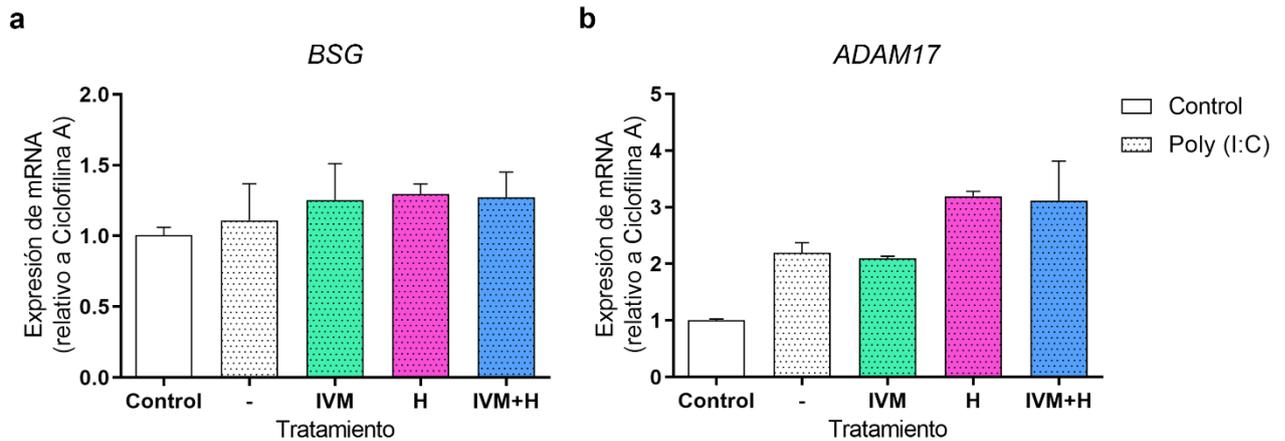


Figura 26. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de BSG y ADAM17 en células A549 tratadas con Poly (I:C) luego del tratamiento con IVM, hemina y su combinación. Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de BSG (a) y ADAM17 (b) luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas.

Luego, analizamos la expresión de *CTSB* en este contexto de simulación de infección viral. Como mencionamos anteriormente, esta proteasa colabora con el ingreso del SARS-CoV-2 a la célula (Jaimes *et al*, 2020). Encontramos que el tratamiento con Poly (I:C) no genera diferencias significativas en la expresión de *CTSB* con respecto al control. Sin embargo, el agregado de IVM y hemina, solas o en combinación, produce un aumento en la expresión de *CTSB* ($p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente) (Figura 27).

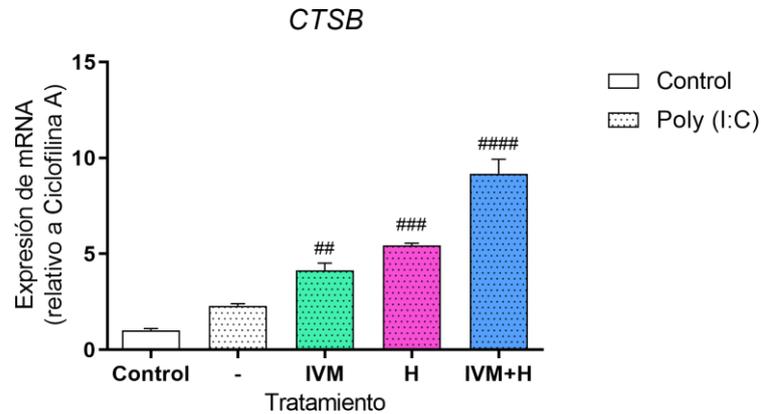


Figura 27. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de *CTSB* en células A549 tratadas con Poly (I:C) luego del tratamiento con IVM, hemina y su combinación. Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *CTSB* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###) y $p < 0,0001$ (####) con respecto al control con Poly (I:C).

En último lugar, analizamos la expresión de genes con características anti-inflamatorias como lo son *HIF1A* y *HSPB1*. Con respecto a *HIF1A*, el tratamiento con Poly (I:C) no modifica significativamente su expresión con respecto al control. A su vez, el tratamiento con IVM o hemina tampoco modifica la expresión de *HIF1A*. Sin embargo, la combinatoria de ambas drogas genera un aumento en su expresión ($p < 0,05$) (**Figura 28**).

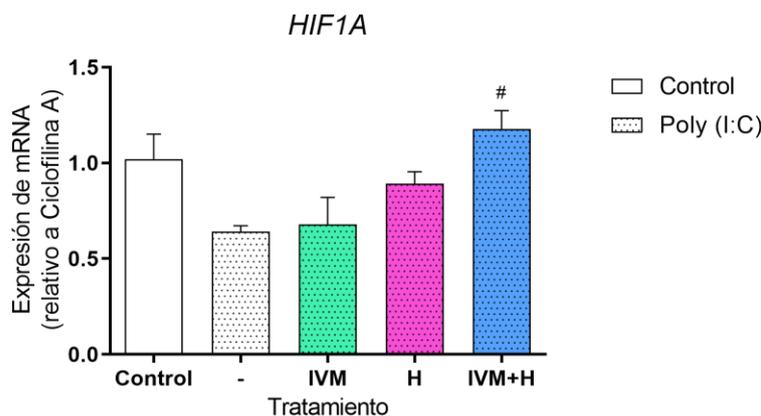


Figura 28. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de *HIF1A* en células A549 tratadas con Poly (I:C) luego del tratamiento con IVM, hemina y su combinación. Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HIF1A* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,05$ (#) con respecto al control con Poly (I:C).

Por último, analizamos la expresión de *HSPB1*, el gen que codifica para HSP27 que como mencionamos anteriormente es una proteína que posee efectos anti-inflamatorios

(Batulan *et al*, 2016; O'Brien y Sandhu, 2020; Inia y O'Brien, 2021). Si bien el tratamiento con Poly (I:C) no altera la expresión de *HSPB1*, encontramos que el tratamiento con IVM, tanto solo como combinado con hemina, genera un aumento en su expresión ($p < 0,0001$) (**Figura 29**).

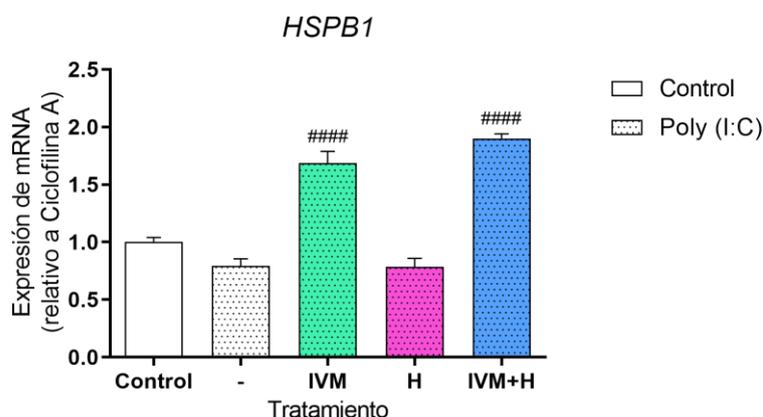


Figura 29. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de *HSPB1* en células A549 tratadas con Poly (I:C) luego del tratamiento con IVM, hemina y la combinación de ambas drogas. Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HSPB1* luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas. $p < 0,0001$ (####) con respecto al control con Poly (I:C).

A continuación, en la **Figura 29** resumimos todos los resultados obtenidos luego del tratamiento con hemina, IVM y la combinación de ambas drogas sobre la expresión de *NFKB1*, genes de la vía de IFN-I, genes de la vía de HO-1, genes relacionados con el ingreso del SARS-CoV-2 y genes anti-inflamatorios durante la simulación de un estado de infección viral.

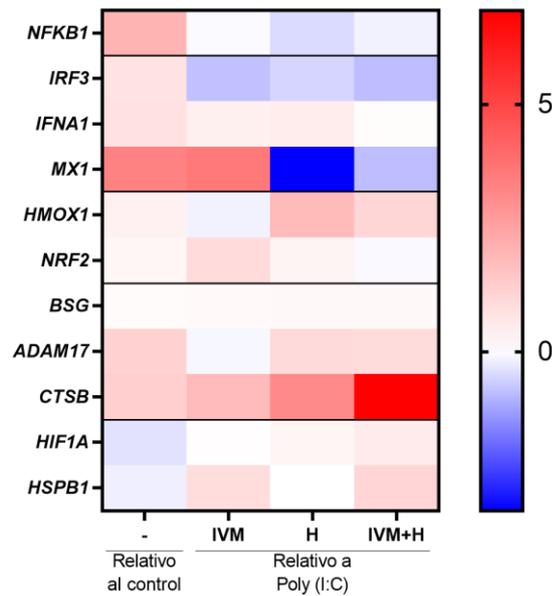


Figura 29. Efecto del tratamiento con las drogas IVM y hemina en la expresión de genes de interés en células A549 tratadas con Poly (I:C). Se transfectaron las células con Poly (I:C) durante 24 horas utilizando lipofectamina y se evaluó por RT-qPCR la expresión de *NFKB1*, genes de la vía de IFN-I, genes de la vía de HO-1, genes relacionados con el ingreso del SARS-CoV-2 y genes anti-inflamatorios, luego del tratamiento con IVM (10 μ M), hemina (80 μ M) o la combinación de dichas drogas.

Discusión

En esta tesina estudiamos el potencial uso de la IVM y la hemina, dos drogas aprobadas tanto por el ANMAT como por la FDA para su uso en humanos, como posibles fármacos capaces de atenuar los efectos de la infección por SARS-CoV-2. Debido a la ausencia de medicamentos antivirales efectivos contra dicha infección, utilizar fármacos previamente aprobados para el tratamiento de otra enfermedad ahorra tiempo y dinero, convirtiendo el reposicionamiento de drogas en una alternativa muy conveniente. En este sentido, los resultados del presente trabajo demuestran que las drogas hemina e IVM son capaces de modular la expresión de genes relacionados con la infección por SARS-CoV-2, de genes antivirales y de genes anti-inflamatorios, sugiriendo una potencial acción antiviral.

Elegimos combinar las drogas IVM y hemina para evaluar su actividad antiviral debido a interesantes antecedentes. Por un lado, se ha demostrado que la IVM, una droga aprobada inicialmente para enfermedades parasitarias en animales posee efectos antivirales contra una amplia variedad de virus (Wagstaff *et al*, 2012; Caly *et al*, 2020). Por otro lado, la hemina, una droga utilizada como tratamiento contra las porfirias, presenta particular interés en este proyecto debido a que es un inductor específico de la expresión de HO-1, una proteína ampliamente estudiada por nuestro grupo en el contexto tumoral, y diversos grupos de investigación han demostrado un rol protector de HO-1 frente a diversos tipos de infecciones virales (Cueno *et al*, 2012; El Kalamouni *et al*, 2019; Hill-Batorski *et al*, 2013; Ma *et al*, 2019; Protzer *et al*, 2007). Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostró que la expresión de *MX1* puede ser modulada por HO-1 en células de cáncer de próstata (Ortiz *et al*, 2020). A su vez, recientemente hemos publicado otro trabajo donde evaluamos la expresión de genes relacionados con la infección por SARS-CoV-2 en un *dataset* de pacientes sanos y con COVID-19 y reportamos que la expresión de *MX1* está aumentada en pacientes infectados, posicionando así a *MX1* como un potencial target terapéutico (Bizzotto *et al*, 2020). Basándonos en dicho antecedente, en el presente proyecto nos centramos en *MX1*, una proteína asociada a la respuesta antiviral contra un amplio espectro de virus (Pavlovic *et al*, 1990; Pavlovic 1992; Kochs *et al*, 2022; Verhelst *et al*, 2013).

El primer objetivo específico de este trabajo fue establecer la dosis óptima a emplear de hemina e IVM en nuestro modelo experimental. Para ello, evaluamos la citotoxicidad de dichas drogas en células A549. En el caso de la hemina, seleccionamos las dosis a evaluar basándonos

en trabajos previos de nuestro laboratorio en diferentes modelos experimentales (Jaworski *et al*, 2017; Ortiz *et al*, 2020; Toro *et al*, 2021). Una vez seleccionado el rango de concentraciones a utilizar (10 a 80 μM) evaluamos su efecto sobre la viabilidad celular. Encontramos que ninguna de las concentraciones afectaba la viabilidad de las células A549 y seleccionamos la dosis de 80 μM ya que era la que inducía en mayor medida la expresión de *HMOXI*. Además, con respecto a su efecto sobre la expresión de *MXI*, la concentración de 80 μM de hemina no generó cambios en su expresión mientras que las dosis más bajas generaban una disminución de la misma. Estos resultados coinciden con antecedentes previos de nuestro laboratorio donde demostramos que la dosis de 80 μM de hemina incrementa la expresión de *MXI* en células de cáncer de próstata, generando también un aumento en la expresión de *HMOXI* (Ortiz *et al*, 2020). En este contexto, resulta interesante mencionar el trabajo realizado por Kim *et al*, donde utilizan a la hemina para inducir la expresión de *HMOXI* como terapia antiviral contra el virus de la Hepatitis A. En dicho trabajo, luego de evaluar distintas dosis, los autores deciden utilizar la concentración de 50 μM , ya que consideran que dicha concentración es la que genera la mejor relación entre la expresión del RNA del virus del Hepatitis A y la expresión de *HMOXI*. Si bien la dosis elegida en este trabajo es mayor, se encuentra dentro del mismo rango de concentraciones y, a su vez, es importante aclarar que en el trabajo de Kim *et al*, utilizan la línea celular de riñón FRhk-4. Por otro lado, con respecto al tratamiento con IVM, elegimos las dosis a evaluar basándonos en antecedentes previos de distintos grupos de investigación (Arevalo *et al*, 2020; Chaccour *et al*, 2021; Krolewiecki *et al*, 2020). Estudiamos el efecto sobre la viabilidad celular en un amplio rango de concentraciones de IVM y observamos que la viabilidad celular se vio afectada por las concentraciones más altas (50 μM , 100 μM y 150 μM) razón por la cual decidimos excluirlas de nuestro estudio. Seleccionamos la concentración de 10 μM para continuar con el proyecto debido a que dicha dosis generó un aumento en la expresión tanto de *MXI* como de *HMOXI*, sugiriendo una posible acción antiviral y anti-inflamatoria. En el trabajo de Caly *et al*, utilizaron una concentración de IVM menor (2,5 μM) para evaluar el efecto antiviral en células renales Vero/hSLAM. Sin embargo, en dicho trabajo los autores realizaron un tratamiento más prolongado con IVM, posible razón por la cual hayan observado un efecto antiviral con una dosis menor. También cabe destacar que en dicho trabajo se utilizaron células de distinto origen, otra variable que también puede determinar la sensibilidad al tratamiento con IVM. Por último, analizamos la viabilidad celular frente a la combinatoria de las drogas IVM y hemina y no observamos efecto citotóxico para ninguno de

los tiempos evaluados. De esta manera, continuamos nuestro análisis evaluando el efecto de las drogas por sí solas como de su combinación a distintos tiempos de tratamiento.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la modulación que encontramos como consecuencia del tratamiento con IVM y hemina sobre distintos genes clave tanto en la infección por SARS-CoV-2 como en la respuesta antiviral y anti-inflamatoria, consideramos de sumo interés estudiar el efecto de nuestras drogas durante la infección viral. Debido a que en nuestro laboratorio no contamos con las normas de bioseguridad necesarias para trabajar con partículas virales, nos vimos obligados a simular un estado de infección viral mediante el tratamiento con Poly (I:C), un análogo sintético del ARN doble cadena, antagonista del receptor TLR3. En particular, la señalización vía TLR3 activa a IRF3, promoviendo la producción de IFN-I, así como también la activación de los factores de transcripción pro-inflamatorios NFκB y AP-1 (Yamamoto *et al*, 2003). Como ya mencionamos anteriormente, nuestros blancos farmacológicos más importantes son *HMOX1* y *MX1*. Al analizar la expresión de *MX1*, encontramos que el tratamiento con IVM y su combinación con hemina aumentan dicha expresión, sugiriendo que la combinación de drogas podría atenuar la infección viral al aumentar la expresión de dicho gen con características antivirales. A su vez, y como esperábamos, encontramos que el tratamiento con Poly (I:C) genera un aumento en la expresión de *MX1* y, más aún, el tratamiento con IVM aumenta la expresión de *MX1* en este contexto donde sus niveles basales de expresión son más elevados. Estos resultados son prometedores ya que demuestran que el tratamiento con IVM induce la expresión de *MX1* en un contexto de infección viral, reforzando la idea de su uso como droga antiviral y avalando lo reportado por Portmann-Baracco *et al*, y Caly *et al*. Con respecto a la expresión de gen *HMOX1*, era esperable que el tratamiento con hemina aumentara su expresión. Sin embargo, es un resultado valioso de este trabajo haber encontrado que la hemina es capaz de inducir *HMOX1* también en la simulación de un estado de infección viral. Así, la inducción de la expresión de *HMOX1* podría ser mediadora de una respuesta anti-inflamatoria esencial para atenuar los efectos nocivos causados por la infección. Para ahondar en el mecanismo del efecto de las drogas sobre *HMOX1* decidimos analizar la expresión de *NRF2*, principal factor de transcripción de *HMOX1* (Loboda *et al*, 2016). Encontramos un resultado similar a la expresión de *HMOX1*, donde el tratamiento con IVM y hemina genera un aumento en su expresión. En cambio, en células tratadas con Poly (I:C) la combinación de las drogas no modifica la expresión de *NRF2*, sin embargo, el tratamiento con IVM la aumenta sugiriendo que en un contexto de infección viral dicha droga

es capaz de inducir la vía de HO-1 modulando los niveles de *NRF2*. Si bien no observamos un aumento en la expresión de *HMOX1* en presencia de IVM, puede ser que dicha modulación se produzca, pero en una ventana temporal distinta a la que estamos evaluando. En este sentido, Huang *et al.*, plantean que el mecanismo de acción antiviral del HO-1 inducido por hemina como tratamiento contra el virus del Zika implica la participación NRF2. Por otra parte, haber encontrado que la expresión de *NRF2* aumenta por el tratamiento con IVM coincide con el reporte de Horowitz y Freeman donde plantean a la IVM como inductor de NRF2. Continuando con los intermediarios que participan de la cascada de activación de TLR3 por Poly (I:C) analizamos el gen *IRF3*, un factor de transcripción que regula los ISGs. El tratamiento con la combinación de las drogas IVM y hemina generó un aumento en la expresión de *IRF3*, sin embargo, en células tratadas con Poly (I:C) la combinación de drogas disminuyó la expresión de *IRF3*, contrarrestando los efectos del estado de simulación de infección viral. En este punto nosotros hubiéramos esperado que los tratamientos con IVM, hemina y su combinación, también aumentarían la expresión de *IRF3*, ya que habíamos observado un aumento en la expresión de *MX1*. Sin embargo, si bien en este trabajo no ahondamos en los mecanismos que subyacen los efectos de la IVM y hemina, pensamos que seguramente haya algún mecanismo alternativo que pueda estar mediando la modulación de *MX1*.

Luego de la activación del IRF3, el mismo dimeriza y transloca al núcleo donde activa la expresión de IFN-I (Zabetakis *et al.*, 2020). Así, el aumento en la expresión de *IRF3* por el tratamiento con Poly (I:C), debería aumentar la expresión de *IFN1A*. Efectivamente, observamos que la expresión de *IFN1A* aumenta en presencia de Poly (I:C) sin embargo, los distintos tratamientos con hemina e IVM no modifican dicha expresión. Como ya mencionamos, sería interesante observar que los tratamientos con IVM, hemina o la combinación de ambas drogas den como resultado un aumento de la expresión de *IFN1A* debido a que los IFN-I tienen potentes efectos antivirales y constituyen la vía que desencadena la expresión de ISGs (Sa Ribero *et al.*, 2020). Sin embargo, como discutimos anteriormente, el efecto de la IVM sobre *MX1* podría estar mediado por otra vía de señalización o estar ocurriendo a tiempos distintos a los evaluados en este trabajo.

Para enfocar nuestro análisis en la infección por SARS-CoV-2, estudiamos el efecto de nuestras drogas sobre genes relacionados con la vía de ingreso a la célula huésped. Para esto, en primera instancia, quisimos evaluar el efecto de los tratamientos con IVM, hemina y la combinación de las drogas sobre la expresión de *ACE2*. Desafortunadamente, y luego probar

con diferentes pares de primers, desistimos de analizar la expresión de *ACE2* ya que no conseguimos medir la expresión de dicho gen en la línea celular A549. Luego de una extensa búsqueda bibliográfica, llegamos a la conclusión de que no pudimos medir la expresión de *ACE2* ya que nuestro modelo celular tiene una expresión muy baja de dicho receptor. Por ejemplo, encontramos que en el trabajo de Mossel *et al*, necesitaron sobreexpresar *ACE2* en la línea celular A549 para usarlo como modelo de estudio de SARS-CoV. A su vez, en el trabajo de Murgolo *et al*, donde estudian el tropismo del SARS-CoV-2 por diferentes líneas celulares, identifican que las células A549 presentan poca expresión de *ACE2*. Sin embargo, esto no quita que dicha línea celular pueda ser infectada por SARS-CoV-2 y sea un modelo experimental adecuado teniendo en cuenta el tropismo del virus por las células epiteliales de pulmón. Así, continuamos nuestro estudio analizando la expresión de *BSG*, una proteína ubicada en la membrana celular que facilita la entrada del SARS-CoV-2 (Wang *et al*, 2020). El tratamiento con IVM y hemina generó un aumento significativo en su expresión, no así en células tratadas con Poly (I:C). En el caso del aumento de la expresión de *BSG*, no se estaría comprobando la acción antiviral de las drogas IVM y hemina, ya que una mayor disponibilidad de *BSG* en la superficie celular responde a una mayor facilidad del SARS-CoV-2 para unirse mediante S y así ingresar a la célula. No obstante, en el estado de simulación de infección viral, nuestras drogas no modificaron la expresión de *BSG*.

Para el caso de *ADAM17*, el tratamiento con IVM y hemina generó un aumento en su expresión, que podría estar proporcionando un efecto antiviral ya que *ADAM17* ayuda a clivar a *ACE2* impidiendo el ingreso del SARS-CoV-2 a la célula huésped (Palau *et al*, 2020); no obstante, el aumento de la expresión no se observó en los tratamientos con las drogas posterior al tratamiento con Poly (I:C).

Por último, analizamos la expresión de *CTSB* y *CTSL*, dos catepsinas capaces de clivar la proteína S del SARS-CoV-2 permitiendo su activación y posterior ingreso a la célula huésped (Jaimes *et al*, 2020). En ambos casos se observó un patrón muy similar en respuesta a los tratamientos. El tratamiento con la combinación de drogas produjo un aumento significativo en la expresión de *CTSB* y *CTSL*. Nosotros esperábamos que la expresión de estas catepsinas disminuyera evitando que faciliten el ingreso del virus a la célula. No obstante, el ingreso principal del SARS-CoV-2 a la célula huésped es mediado por *ACE2* y *TMPRSS2*, por lo cual el aumento en la expresión de las catepsinas podría estar favoreciendo una vía alternativa de ingreso.

Enfocaremos la última parte de esta discusión en genes involucrados en la respuesta inflamatoria. En primer lugar, queremos destacar que, como era de esperar, la expresión del gen *NFKB1* aumentó luego del tratamiento con Poly (I:C). Resultados similares se observan en el trabajo de Kumar *et al*, donde el Poly (I:C) induce la expresión de *NFKB1*, la producción de citocinas, de quimiocinas y de IFN-I en células de epitelio corneal humano. El tratamiento con hemina disminuyó significativamente la expresión de *NFKB1*, demostrando el potencial anti-inflamatorio de la inducción de HO-1. Por otra parte, quisimos complementar nuestro análisis evaluando la actividad de NFκB mediante la transfección transitoria de un vector reportero para dicho factor de transcripción, que contiene repeticiones de la secuencia consenso de unión de *NFKB1* río arriba del gen la luciferasa (NFκB-LUC, gentilmente cedido por la Dra. Mónica Costas). Lamentablemente a lo largo de esta tesina no logramos la correcta puesta a punto de las condiciones para co-transfectar con Poly (I:C) y dicho vector, por lo que no pudimos incluir dicho análisis. Sin embargo, no descartamos poder medir la actividad de NFκB en un futuro cercano.

Otro gen relevante en la infección por SARS-CoV-2, es *HIF1A* ya que disminuye los niveles tanto de ACE2 como de TMPRSS2, y genera un aumento en la expresión de *ADAM17* (Serebrovska *et al*, 2020). Encontramos que el tratamiento con IVM y hemina aumenta su expresión tanto en condiciones basales como en células tratadas con Poly (I:C). Consideramos que el aumento de la expresión de *HIF1A* aporta a la acción antiviral de nuestras drogas ya que como mencionamos anteriormente, HIF-1α inhibe a el ingreso del SARS-CoV-2 a la célula huésped (Serebrovska *et al*, 2020). No obstante, en el trabajo realizado por Tian *et al*, analizan *datasets* de pacientes con COVID-19 y realizan estudios en diferentes líneas celulares incluyendo a la línea A549, y reportan que la proteína ORF3a del SARS-CoV-2 promueve la producción de HIF-1α a través de la inducción de daños mitocondriales. Sin embargo, consideramos que la inducción de HIF-1α puede ser en respuesta a la infección y como estrategia celular para atenuar los efectos de la infección viral.

Por último, nos enfocamos en *HSPB1*, el gen que codifica para la proteína HSP27 que, entre diversas funciones, posee actividad anti-inflamatoria (Batulan *et al*, 2016; O'Brien y Sandhu, 2020; Inia y O'Brien, 2021). Tanto en condiciones basales como en células tratadas con Poly (I:C), la combinatoria de drogas generó un aumento en la expresión de *HSPB1*. En este sentido, no queremos dejar de mencionar los resultados obtenidos en el trabajo de Tong *et*

al, donde probaron por primera vez que *HSPB1* puede funcionar como una proteína antiviral durante la infección del virus de la Hepatitis B, induciendo específicamente la vía de IFN-I. Así, el aumento de *HSPB1* también podría estar mediando la respuesta antiviral.

Conclusiones y Perspectivas a futuro

Conclusión

En esta Tesina se identificó que las drogas IVM, hemina y su combinación modulan genes relacionados con la infección por SARS-CoV-2, genes antivirales y genes anti-inflamatorios en la línea celular A549, no solo en condiciones basales sino también de simulación de una infección viral mediante el tratamiento con Poly (I:C). Así, el tratamiento con la combinación de drogas genera un aumento en la expresión de los genes *HMOX1* y *MX1*, sugiriendo que un tratamiento combinando ambas drogas potenciaría el efecto antiviral y anti-inflamatorio de las drogas por separado.

Perspectivas a futuro

Los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores. Sin embargo, es necesario continuar nuestro estudio para poder aumentar su alcance. En primer lugar, planeamos estudiar el efecto de nuestras drogas sobre la expresión proteica de los mediadores estudiados en el presente trabajo. Por otro lado, también queremos complementar este estudio *in vitro* evaluando el efecto de la IVM y la hemina en líneas celulares provenientes de otros tejidos, ya que el SARS-CoV-2 también presenta tropismo hígado, cerebro, intestino y riñón (Murgolo *et al*, 2021; Puelles *et al*, 2020).

Con el propósito de seguir profundizando los resultados de este trabajo, se espera no solo probar las drogas IVM y hemina en otros modelos *in vitro* sino también *in vivo*, para esto estamos estableciendo una colaboración con el grupo de la Dra. Crispo (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay) para la utilización de un modelo murino de infección por Coronavirus (Arevalo *et al*, 2021; Crispo *et al*, 2013).

Bibliografía

AHMETAJ-SHALA, Blerina, et al. Cardiorenal tissues express SARS-CoV-2 entry genes and basigin (BSG/CD147) increases with age in endothelial cells. *Basic to Translational Science*, 2020, vol. 5, no 11, p. 1111-1123.

ANDERSON, Karl E., et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Annals of internal medicine*, 2005, vol. 142, no 6, p. 439-450

ANDERSON, Karl E.; COLLINS, Stephen. Open-label study of hemin for acute porphyria: clinical practice implications. *The American journal of medicine*, 2006, vol. 119, no 9, p. 801. e1-801. e6.

AREVALO, Ana Paula, et al. Ivermectin reduces coronavirus infection in vivo: a mouse experimental model. *bioRxiv*, 2020.

ARÉVALO, A. P., et al. Ivermectin reduces in vivo coronavirus infection in a mouse experimental model. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, no 1, p. 1-12.

ARRUDA DE SOUZA MONNERAT, Juliana, et al. Micronutrients and bioactive compounds in the immunological pathways related to SARS-CoV-2 (adults and elderly). *European Journal of Nutrition*, 2021, vol. 60, no 2, p. 559-579.

ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 2004, vol. 3, no 8, p. 673-683.

AZNAR, M. Angela, et al. Immunotherapeutic effects of intratumoral nanoplexed poly I: C. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2019, vol. 7, no 1, p. 1-16.

BATULAN, Zarah, et al. Extracellular release and signaling by heat shock protein 27: role in modifying vascular inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2016, vol. 7, p. 285.

BERLIN, D. A.; GULICK, R. M.; MARTINEZ, F. J. Severe COVID-19 [published online ahead of print May 15, 2020]. *N Engl J Med*, vol. 10.

BIZZOTTO, Juan, et al. SARS-CoV-2 infection boosts MX1 antiviral effector in COVID-19 patients. *Iscience*, 2020, vol. 23, no 10, p. 101585.

BORDEN, Ernest C., et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews Drug discovery*, 2007, vol. 6, no 12, p. 975-990.

BRIAN, D. A.; BARIC, R. S. Coronavirus genome structure and replication. *Coronavirus replication and reverse genetics*, 2005, p. 1-30.

CALY, Leon, et al. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral research*, 2020, vol. 178, p. 104787.

CHACCOUR, Carlos, et al. The effect of early treatment with ivermectin on viral load, symptoms and humoral response in patients with non-severe COVID-19: A pilot, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *EClinicalMedicine*, 2021, vol. 32, p. 100720.

CRISPO, Martina, et al. Transgenic mouse model harboring the transcriptional fusion ccl20-luciferase as a novel reporter of pro-inflammatory response. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no 11, p. e78447.

CRUMP, Andy; OMURA, Satoshi. Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2011, vol. 87, no 2, p. 13-28.

CUADRADO, Antonio, et al. Can activation of NRF2 be a strategy against COVID-19?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2020.

CUENO, M. E.; IMAI, K.; OCHIAI, K. Heme oxygenase-1 reverses HIV-1 Tat activity: prospects for AIDS prevention. *Retrovirology*, 2012, vol. 9, no 2, p. 1-1.

DEL RIO, Carlos; COLLINS, Lauren F.; MALANI, Preeti. Long-term health consequences of COVID-19. *Jama*, 2020, vol. 324, no 17, p. 1723-1724.

DEL VALLE PÉREZ, Lázaro, et al. Efecto *in vitro* de la hemina sobre la proliferación de los linfocitos humanos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 2002, vol. 18, no 2, p. 0-0.

DEOTARSE, P. P., et al. Drug repositioning: a review. *Int. J. Pharma. Res Rev*, 2015, vol. 4, p. 51-58.

DOS SANTOS, Wagner Gouvea. Impact of virus genetic variability and host immunity for the success of COVID-19 vaccines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, p. 111272.

DULAK, Jozef, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation*, 2008, vol. 117, no 2, p. 231-241.

ELGUERO, Belen, et al. Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation. *Neoplasia*, 2012, vol. 14, no 11, p. 1043-1056.

EL KALAMOUNI, Chaker, et al. Subversion of the heme oxygenase-1 antiviral activity by Zika virus. *Viruses*, 2019, vol. 11, no 1, p. 2.

ELDER, George H.; HIFT, Richard J.; MEISSNER, Peter N. The acute porphyrias. *The Lancet*, 1997, vol. 349, no 9065, p. 1613-1617.

FERRANDO, M., et al. Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis*, 2011, vol. 14, no 4, p. 467-479.

FRICKE, Thomas, et al. MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. *Retrovirology*, 2014, vol. 11, no 1, p. 1-14.

GANDINI, Norberto A., et al. Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. *Tumor Biology*, 2014, vol. 35, no 3, p. 2803-2815.

GANDINI, Norberto Ariel, et al. Heme oxygenase-1 has an antitumor role in breast cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 2019, vol. 30, no 18, p. 2030-2049.

GLEBOV, Oleg O. Understanding SARS-CoV-2 endocytosis for COVID-19 drug repurposing. *The FEBS journal*, 2020, vol. 287, no 17, p. 3664-3671.

GONZALEZ, P.; A GONZÁLEZ, F.; UENO, K. Ivermectin in human medicine, an overview of the current status of its clinical applications. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2012, vol. 13, no 6, p. 1103-1109.

GOZZELINO, Raffaella; JENEY, Viktoria; SOARES, Miguel P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2010, vol. 50, p. 323-354.

GORDON, David E., et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 2020, vol. 583, no 7816, p. 459-468.

GROCHOT-PRZECZEK, Anna; DULAK, Jozef; JOZKOWICZ, Alicja. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clinical science*, 2012, vol. 122, no 3, p. 93-103.

GUERON, Geraldine, et al. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Molecular cancer research*, 2009, vol. 7, no 11, p. 1745-1755.

HALLER, Otto; STAEHELI, Peter; KOCHS, Georg. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 2007, vol. 89, no 6-7, p. 812-818.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in immunology*, 2020.

HILL-BATORSKI, Lindsay, et al. The cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 suppresses Ebola virus replication. *Journal of virology*, 2013, vol. 87, no 24, p. 13795-13802.

HODOS, Rachel A., et al. In silico methods for drug repurposing and pharmacology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2016, vol. 8, no 3, p. 186-210.

HOFFMANN, Markus, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 2020, vol. 181, no 2, p. 271-280. e8.

HOROWITZ, Richard I.; FREEMAN, Phyllis R. Three novel prevention, diagnostic, and treatment options for COVID-19 urgently necessitating controlled randomized trials. *Medical hypotheses*, 2020, vol. 143, p. 109851.

HUANG, Chaolin, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, 2020, vol. 395, no 10223, p. 497-506.

HUANG, Hanxia, et al. Nrf2-dependent induction of innate host defense via heme oxygenase-1 inhibits Zika virus replication. *Virology*, 2017, vol. 503, p. 1-5.

HSU, F. F., et al. Signal peptide peptidase-mediated nuclear localization of heme oxygenase-1 promotes cancer cell proliferation and invasion independent of its enzymatic activity. *Oncogene*, 2015, vol. 34, no 18, p. 2360-2370.

ILIEV, Dimitar B., et al. MyD88 interacts with interferon regulatory factor (IRF) 3 and IRF7 in Atlantic salmon (*Salmo salar*): transgenic SsMyD88 modulates the IRF-induced type I interferon response and accumulates in aggresomes. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, no 49, p. 42715-42724.

INIA, Jose A.; O'BRIEN, Edward R. Role of heat shock protein 27 in modulating atherosclerotic inflammation. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2021, vol. 14, no 1, p. 3-12.

IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 2014, vol. 14, no 1, p. 36-49.

JAIMES, Javier A.; MILLET, Jean K.; WHITTAKER, Gary R. Proteolytic cleavage of the SARS-CoV-2 spike protein and the role of the novel S1/S2 site. *IScience*, 2020, vol. 23, no 6, p. 101212.

JAWORSKI, Felipe M., et al. In vivo hemin conditioning targets the vascular and immunologic compartments and restrains prostate tumor development. *Clinical Cancer Research*, 2017, vol. 23, no 17, p. 5135-5148.

KIM, Dong-Hwi, et al. Heme Oxygenase-1 Exerts Antiviral Activity against Hepatitis A Virus In Vitro. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, no 8, p. 1229.

KING, Cason R., et al. Inhibition of human adenovirus replication by the importin α/β 1 nuclear import inhibitor ivermectin. *Journal of Virology*, 2020, vol. 94, no 18, p. e00710-20.

KOCHS, Georg, et al. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no 5, p. 3153-3158.

KÖRNER, Robert W., et al. Of mice and men: the coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2. *Viruses*, 2020, vol. 12, no 8, p. 880.

KROLEWIECKI, Alejandro, et al. Antiviral effect of high-dose ivermectin in adults with COVID-19: a pilot randomised, controlled, open label, multicentre trial. 2020.

KUMAR, B. Suresh, et al. A wonder drug in the arsenal against COVID-19: medication evidence from ivermectin. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 2020, p. 30-37.

KUMAR, Ashok; ZHANG, Jing; YU, Fu-Shin X. Toll-like receptor 3 agonist poly (I: C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology*, 2006, vol. 117, no 1, p. 11-21.

LAMBERT, Daniel W., et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no 34, p. 30113-30119.

LE BON, A. Tough DF 2002 Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*, vol. 14, p. 432-436.

LEE, T. S. Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*, 2002, vol. 8, p. 240-246.

LESPINE, Anne, et al. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chemico-biological interactions*, 2006, vol. 159, no 3, p. 169-179.

LEVY, David E.; MARIÉ, Isabelle J.; DURBIN, Joan E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current opinion in virology*, 2011, vol. 1, no 6, p. 476-486.

LI, Jianfeng; LIU, Yin; ZHANG, Xuming. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. *Journal of virology*, 2010, vol. 84, no 13, p. 6472-6482.

- LI, Yang, et al. Antibody landscape against SARS-CoV-2 reveals significant differences between non-structural/accessory and structural proteins. *Cell Reports*, 2021, vol. 36, no 2, p. 109391.
- LIEBER, Michael, et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer*, 1976, vol. 17, no 1, p. 62-70.
- LIU, P. P., et al. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2019, vol. 4, no 29, p. 10.1038.
- LOBODA, Agnieszka, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 2016, vol. 73, no 17, p. 3221-3247.
- MA, Lin-Lin, et al. heme oxygenase-1 agonist CoPP suppresses influenza virus replication through IRF3-mediated generation of IFN- α/β . *Virology*, 2019, vol. 528, p. 80-88.
- MANTLO, Emily, et al. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. *Antiviral research*, 2020, vol. 179, p. 104811.
- MARÍN-HERNÁNDEZ, Alvaro. El factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales. *Revista de Educación Bioquímica*, 2009, vol. 28, no 2, p. 42-51.
- MASCARÓ, Marilina, et al. Nuclear Localization of Heme Oxygenase-1 in Pathophysiological Conditions: Does It Explain the Dual Role in Cancer?. *Antioxidants*, 2021, vol. 10, no 1, p. 87.
- MEHMOOD, Iqra, et al. SARS-CoV-2: An update on genomics, risk assessment, potential therapeutics and vaccine development. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, vol. 18, no 4, p. 1626.
- MOSSEL, Eric C., et al. Exogenous ACE2 expression allows refractory cell lines to support severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *Journal of virology*, 2005, vol. 79, no 6, p. 3846-3850.
- MURAMATSU, T.; MIYAUCHI, T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histology and histopathology*, 2003.
- MURGOLO, Nicholas, et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathogens*, 2021, vol. 17, no 2, p. e1009225.
- NYAYANIT, Dimpal A., et al. Natural Selection Plays an Important Role in Shaping the Codon Usage of Structural Genes of the Viruses Belonging to the Coronaviridae Family. *Viruses*, 2021, vol. 13, no 1, p. 3.
- O'BRIEN, Edward R.; SANDHU, Jagdeep K. Sex differences in COVID-19 mortality: opportunity to develop HSP27 (HSPB1) immunotherapy to treat hyper-inflammation?. *Cell Stress and Chaperones*, 2020, vol. 25, no 5, p. 725-729.
- O'NEILL, Luke AJ; BOWIE, Andrew G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 2007, vol. 7, no 5, p. 353-364.
- ORTIZ, Emiliano, et al. Myxovirus Resistance Protein 1 (MX1), a Novel HO-1 Interactor, Tilts the Balance of Endoplasmic Reticulum Stress towards Pro-Death Events in Prostate Cancer. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no 7, p. 1005.

- OU, Xiuyuan, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, 2020, vol. 11, no 1, p. 1-12.
- PADMANABHAN, Pranesh; DESIKAN, Rajat; DIXIT, Narendra M. Targeting TMPRSS2 and Cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection. *PLoS computational biology*, 2020, vol. 16, no 12, p. e1008461.
- PALAU, Vanesa; RIERA, Marta; SOLER, María José. ADAM17 inhibition may exert a protective effect on COVID-19. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2020, vol. 35, no 6, p. 1071-1072.
- PAVLOVIC, J., et al. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *Journal of virology*, 1990, vol. 64, no 7, p. 3370-3375.
- PAVLOVIC, Jovan; HALLER, O. T. T. O.; STAEHELI, Peter. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of virology*, 1992, vol. 66, no 4, p. 2564-2569.
- PAYNE, Susan. Family coronaviridae. *Viruses*, 2017, p. 149.
- PERLMAN, Stanley. Another decade, another coronavirus. 2020.
- PORTMANN-BARACCO, Arianna; BRYCE-ALBERTI, Mayte; ACCINELLI, Roberto Alfonso. Antiviral and anti-inflammatory properties of ivermectin and its potential use in covid-19. *Archivos de bronconeumologia*, 2020, vol. 56, no 12, p. 831.
- PROTZER, Ulrike, et al. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 2007, vol. 133, no 4, p. 1156-1165.
- PUELLES, Victor G., et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine*, 2020, vol. 383, no 6, p. 590-592.
- QIN, C., et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am*, 2020.
- RAGAB, Dina, et al. The COVID-19 cytokine storm; what we know so far. *Frontiers in immunology*, 2020, vol. 11, p. 1446.
- RATIA, Kiira, et al. A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no 42, p. 16119-16124.
- RUBIN, Daniel, et al. FDA approval of remdesivir—a step in the right direction. *New England Journal of Medicine*, 2020, vol. 383, no 27, p. 2598-2600.
- RYTER, Stefan W.; CHOI, Augustine MK. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Translational Research*, 2016, vol. 167, no 1, p. 7-34.
- SA RIBERO, Margarida, et al. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS pathogens*, 2020, vol. 16, no 7, p. e1008737
- SACCA, Paula, et al. Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *British journal of cancer*, 2007, vol. 97, no 12, p. 1683-1689.

- SANDERS, James M., et al. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*, 2020, vol. 323, no 18, p. 1824-1836.
- SCHOGGINS, John W.; RICE, Charles M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current opinion in virology*, 2011, vol. 1, no 6, p. 519-525.
- SEREBROVSKA, Zoya O., et al. Hypoxia, HIF-1 α , and COVID-19: from pathogenic factors to potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, vol. 41, no 12, p. 1539-1546.
- SHARUN, Khan, et al. Ivermectin, a new candidate therapeutic against SARS-CoV-2/COVID-19. 2020.
- SIMMONS, Graham, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 33, p. 11876-11881.
- STREICHER, Felix; JOUVENET, Nolwenn. Stimulation of innate immunity by host and viral RNAs. *Trends in immunology*, 2019, vol. 40, no 12, p. 1134-1148.
- TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, no 6, p. 805-820.
- TEJARO, John R. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Current opinion in virology*, 2016, vol. 16, p. 31-40.
- TENHUNEN, Raimo; MARVER, Harvey S.; SCHMID, Rudi. Microsomal heme oxygenase: characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, vol. 244, no 23, p. 6388-6394.
- THOMPSON, M. R.; KAMINSKI, J. J. KURT--JONES, EA & FITZGERALD, KA 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, vol. 3.
- THOMPSON, Mikayla R., et al. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, 2011, vol. 3, no 6, p. 920-940.
- TIAN, Mingfu, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, vol. 6, no 1, p. 1-13.
- TONG, Shi-Wen, et al. HSPB1 is an intracellular antiviral factor against hepatitis B virus. *Journal of cellular biochemistry*, 2013, vol. 114, no 1, p. 162-173.
- TORO, Ayelén, et al. Novel Interplay between p53 and HO-1 in Embryonic Stem Cells. *Cells*, 2021, vol. 10, no 1, p. 35.
- ULRICH, Henning; PILLAT, Micheli M. CD147 as a target for COVID-19 treatment: suggested effects of azithromycin and stem cell engagement. *Stem cell reviews and reports*, 2020, vol. 16, no 3, p. 434-440.
- VERHELST, Judith; HULPIAU, Paco; SAELENS, Xavier. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, vol. 77, no 4, p. 551-566.
- VERICAT, Javier Megías. *Efectos de la hemo oxigenasa-1 en modelos celulares de patologías inflamatorias crónicas*. Universitat de Valencia (Spain), 2009.

WAGSTAFF, Kylie M., et al. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal*, 2012, vol. 443, no 3, p. 851-856.

WANG, Ke, et al. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *BioRxiv*, 2020.

WANG, Manli, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research*, 2020, vol. 30, no 3, p. 269-271.

WONG, Hui-Hsing, et al. Examination of clinical trial costs and barriers for drug development final. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Novel coronavirus (2019-nCoV) situation report - 1*. (2020)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Weekly epidemiological update on COVID-19 - 17 Aug 2021* (2021)

WU, Aiping, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell host & microbe*, 2020, vol. 27, no 3, p. 325-328.

XIA, Hongjie, et al. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2. *Cell reports*, 2020, vol. 33, no 1, p. 108234.

XU, Jincheng, et al. SARS-CoV-2 induces transcriptional signatures in human lung epithelial cells that promote lung fibrosis. *Respiratory research*, 2020, vol. 21, no 1, p. 1-12.

XUE, Hanqing, et al. Review of drug repositioning approaches and resources. *International journal of biological sciences*, 2018, vol. 14, no 10, p. 1232.

YAMAMOTO, Masahiro, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 2003, vol. 301, no 5633, p. 640-643.

ZABETAKIS, Ioannis, et al. COVID-19: the inflammation link and the role of nutrition in potential mitigation. *Nutrients*, 2020, vol. 12, no 5, p. 1466.

ZOU, Chaoxia, et al. Heme oxygenase-1 retards hepatocellular carcinoma progression through the microRNA pathway. *Oncology reports*, 2016, vol. 36, no 5, p. 2715-2722.