



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**"Análisis de la expresión de la proteína ciclooxygenasa-2 en cultivos infectados con el virus Junín"**

Tesina para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires.

**Autora:** Gravano María Belén

**Directora de tesis:** Dra. Sandra Myriam Cordo

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Procesos Moleculares de la Interacción Virus-Célula. Departamento de Química Biológica, FCE y N-UBA, IQUIBICEN-CONICET.

Buenos Aires, 27 de Octubre de 2023

Gravano María Belén  
Tesinista

Cordo Myriam Sandra  
Directora



# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Familia Arenaviridae .....</b>	<b>10</b>
1.1. Clasificación.....	10
1.2. Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) .....	11
1.2.1. Reservorio y dispersión .....	11
1.2.2. Sintomatología .....	12
1.2.3. Prevención y tratamiento.....	12
1.3. Virus Junín.....	13
1.3.1. Estructura.....	13
1.3.2. Organización genómica.....	13
1.3.3. Ciclo de replicación.....	14
<b>2. Inmunidad innata .....</b>	<b>16</b>
2.1. Respuesta celular a las infecciones virales .....	16
<b>3. Ciclooxygenasas .....</b>	<b>17</b>
3.1. Función y localización.....	17
3.2. Arquitectura génica y regulación de la expresión de COX .....	18
3.3. Estructura y actividad enzimática.....	19
3.4. Producción de prostaglandinas .....	21
3.5. COX-2 en el contexto de infecciones virales .....	23
3.6. Intervención farmacológica de COX-2 (Inhibidores de COX-2).....	25
3.7. Antecedentes de Etoricoxib.....	26
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>1. HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Objetivo general.....</b>	<b>29</b>
2.1. Objetivos específicos .....	29
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>1. Cultivos celulares.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Obtención de stocks de virus Junín (JUNV).....</b>	<b>31</b>
<b>3. Titulación con el Método de Unidades Formadoras de Placas (UFP).....</b>	<b>31</b>
<b>4. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....</b>	<b>32</b>

<b>5. Extracción y cuantificación de ARN .....</b>	<b>33</b>
<b>6. Western Blot.....</b>	<b>35</b>
<b>7. Análisis de la viabilidad celular .....</b>	<b>36</b>
<b>8. Inhibición del rendimiento viral .....</b>	<b>36</b>
<b>9. Actividad virucida.....</b>	<b>37</b>
<b>10. Análisis Estadístico .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Producción del virus Junín.....</b>	<b>39</b>
<b>2. Expresión de COX-2 en cultivos A549 .....</b>	<b>40</b>
<b>3. Estudio de la expresión de COX-2 durante la infección con JUNV .....</b>	<b>42</b>
3.1. Análisis de la expresión de COX-2 por RT- PCR.....	42
3.2. Análisis de la expresión de COX-2 por inmunomarcación.....	43
3.3. Inhibición de la actividad enzimática de COX-2 en cultivos infectados .....	47
3.4. Actividad virucida de Etoricoxib .....	48
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

# Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN copia  
ADNdc: ADN doble cadena  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNag: ARN antigenómico  
ARNdc: ARN doble cadena  
ARNm: ARN mensajero  
BSA: seroalbúmina bovina  
CC: control sin infectar  
CC50: concentración citotóxica 50  
CE50: concentración efectiva 50  
COX-1: Ciclooxigenasa 1  
COX-2: Ciclooxigenasa 2  
DABCO: 1,4-diazabicyclo octano  
DAPI: diclorhidrato de 4',6-diamidino-2 fenilindol  
ETO: Etoricoxib  
FHA: fiebre hemorrágica argentina  
GP1 y GP2: glicoproteínas 1 y 2 de los arenavirus  
GL: gotas lipídicas  
GPC: complejo glicoproteico  
h: hora  
HRP: enzima peroxidasa  
IC50: concentración inhibitoria 50  
IFN: Interferón  
IGR: regiones intergénicas  
IS: índice de selectividad  
JUNV: virus Junín  
L: polimerasa de JUNV  
LASV: virus Lassa  
LCMV: virus de la Coriomeningitis linfocítica  
LUJV: virus Lujo  
MACV: virus Machupo

MEM: medio esencial mínimo de Eagle  
MOI: multiplicidad de infección  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio  
NFkB: kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NP: nucleoproteína de los arenavirus  
NW: New World, Nuevo Mundo  
OW: Old World, Viejo Mundo  
p.i.: post infección  
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos  
pb: pares de bases  
PBS: buffer fosfato salino  
PBST: buffer fosfato salino-Tween  
PFA: paraformaldehído  
PMA: forbol-12-miristato-13-acetato  
PRR: receptores de reconocimiento de patrones  
PTGS-1: prostaglandina-endoperóxido sintasa 1  
PTGS-2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2  
RE: retículo endoplasmático  
RIG-I: retinoicacid-inducible gene I  
RNP: ribonucleoproteína  
RT-PCR: PCR en tiempo real  
SFB: suero fetal bovino  
SSP: péptido señal  
TfR1: receptor de transferrina 1  
TLR: Toll-like receptor  
UFP: unidades formadoras de placas  
Viperina (VIP): virus inhibitory protein endoplasmic reticulum-associated interferon inducible  
WB: western blot  
Z: proteína de matriz de JUNV

# Resumen

---

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una proteína de expresión inducible, clave en la biosíntesis de ácido araquidónico y prostaglandinas. Es una enzima relevante dentro de la respuesta innata y partícipe de la activación de vías inflamatorias y anti-apoptóticas. Además, diversos trabajos han demostrado la función de esta proteína en distintas infecciones virales.

Por ejemplo, virus como hepatitis C, hepatitis B, dengue y SARS-CoV-2 regulan la expresión de COX-2. En estos casos, el aumento de expresión contribuiría tanto a la replicación como a la patogénesis viral, es decir, presenta una función pro-viral. Un único trabajo reportó la regulación negativa del mensajero de esta enzima por la cepa virulenta del arenavirus LCMV-WE, mientras que la cepa no virulenta LCMV-Arm si indujo la expresión del mensajero. Sin embargo, el estudio de COX-2 en la replicación de los arenavirus no ha sido abordado hasta el momento. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si la infección con el arenavirus Junín (JUNV) produce un cambio en la expresión de COX-2 en la línea celular humana A549. Se determinaron los niveles de ARNm de COX-2 por RT-PCR y los niveles de expresión de esta proteína por inmunomarcación. Se encontró que el mensajero se incrementó en 2.25 veces a las 24 h p.i., en comparación con los cultivos controles sin infectar. Cuando se estudiaron distintos tiempos de infección se observó que a las 5 h p.i. el número de células positivas para COX-2 no fue significativamente mayor a los valores basales correspondientes al 20%. Sin embargo, a las 48 h p.i. se determinó un incremento significativo de expresión del 40% en los cultivos infectados. Además, se observó que el patrón de expresión de esta enzima en los cultivos infectados fue principalmente citoplasmático y puntillado en comparación con el patrón difuso observado al estimular la expresión de COX-2 con PMA.

Por otra parte, para estudiar la función de esta enzima durante el ciclo de replicación de JUNV, se utilizó Etoricoxib, un inhibidor selectivo de COX-2. Se determinó que esta droga no posee actividad virucida sobre JUNV y que la inhibición selectiva de COX-2 reduce la producción viral (UFP/ml) en un 70%. En estas condiciones la viabilidad se mantuvo siempre por encima del 80%, medida por el método de MTT.

De estos resultados se puede concluir que la infección con JUNV induce la expresión de la enzima celular COX-2 a partir de las 24 h p.i. en los cultivos infectados. Para el mismo lapso de tiempo la inhibición de su actividad enzimática, con Etoricoxib, reduce significativamente la multiplicación viral. Esto sugiere que COX-2 tiene una función pro-viral, necesaria para el normal desarrollo del ciclo de multiplicación de JUNV. Aunque no se determinó la función específica de COX-2 durante el mismo, se comprobó que la droga no afecta la estructura del virión, es decir no tiene actividad virucida. Más estudios deberán realizarse para determinar la función de esta enzima celular y el significado biológico de su expresión durante la replicación de JUNV y otros arenavirus.



# Abstract

---

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible expression protein, key in the biosynthesis of arachidonic acid and prostaglandins. It is a relevant enzyme within the innate response and participates in the activation of inflammatory and anti-apoptotic pathways. In addition, various studies have demonstrated the function of this protein in different viral infections.

For example, viruses such as hepatitis C, hepatitis B, dengue and SARS-CoV-2 regulate COX-2 expression. In these cases, the increased expression would contribute both to viral replication and pathogenesis, that is, they have a pro-viral function. A single study reported the negative regulation of the messenger of this enzyme by the virulent strain of the arenavirus LCMV-WE, while the non-virulent strain LCMV-Arm did induce the expression of the messenger. However, the study of COX-2 in arenavirus replication has not been addressed so far. Therefore, the objective of this work was to determine if infection with the Junín arenavirus (JUNV) produces a change in the expression of COX-2 in the human cell line A549. COX-2 mRNA levels were determined by RT-PCR and expression levels of this protein by immunostaining. It was found that the messenger was increased 2.25 times at 24 h p.i., compared to uninfected control cultures. When different infection times were studied, it was observed that at 5 h p.i. the number of COX-2 positive cells was not significantly higher than the basal values corresponding to 20%. However, at 48 h p.i. a significant increase in expression of 40% was determined in the infected cultures. In addition, it was observed that the expression pattern of this enzyme in the infected cultures was mainly cytoplasmic and punctate in comparison with the diffuse pattern observed when stimulating the expression of COX-2 with PMA.

On the other hand, to study the function of this enzyme during the JUNV replication cycle, Etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor, was used. It was determined that this drug does not have virucidal activity against JUNV and the selective inhibition of COX-2 reduces viral production (UFP/ml) by 70%. Under these conditions, the viability was always maintained above 80%, measured by the MTT method.

From these results it can be concluded that infection with JUNV induces the expression of the COX-2 cellular enzyme at 24 h p.i. in infected cultures. For the same period of time, the inhibition of its enzymatic activity, with Etoricoxib, significantly reduces viral multiplication. This suggests that COX-2 has a pro-viral function, necessary for the normal development of the JUNV multiplication cycle. Although the specific function of COX-2 was not determined, it was ruled out that the drug does not affect the structure of the virion, that is, it does not have virucidal activity. Further studies will need to be performed to determine the function of this cellular enzyme and the biological significance of its expression during replication of JUNV and other arenaviruses.

# Introducción

---

# 1.Familia Arenaviridae

## 1.1. Clasificación

La familia *Arenaviridae* comprende una gran diversidad de virus a ARN localizados en diferentes regiones del mundo. La clasificación de sus miembros se realiza según comparaciones de secuencias codificantes de genomas completos (PASC). Se comparan secuencias de los genes de la nucleoproteína viral (NP) y de la ARN polimerasa viral (L). Su identidad debe ser mayor al 40% y 35% respectivamente, para que sean considerados virus de un mismo género. Por otro lado, características adicionales como la arquitectura del genoma, el rango de huésped, los modos de transmisión y/o los sitios de replicación en la célula permitieron recientemente establecer dentro de esta familia cuatro géneros: *Antennavirus*, *Hartmanivirus*, *Mammarenavirus* y *Reptarenavirus* (Radoshitzky y de la Torre, 2019).

Históricamente, según su filogenia, propiedades antigénicas y localización geográfica se ha clasificado a los miembros del género *Mammarenavirus* en dos grupos. El serogrupo del Viejo Mundo (Old World: OW) o serogrupo Lassa-LCMV presente en África; y el serogrupo del Nuevo Mundo (New World: NW) o serogrupo Tacaribe presente en América.

En la **Figura 1** se muestra la distribución geográfica de los mammarenavirus pertenecientes al NW, al igual que, el reservorio principal de cada uno. La imagen indica tanto los virus no patogénicos, como los patogénicos para el hombre. El virus Junín (JUNV, Argentina), virus Machupo (MACV, Bolivia), virus Chapare (CHAPV, Bolivia), virus Sabiá (SABV, Brasil) y virus Guanarito (GTOV, Venezuela) son los responsables de los síndromes febriles hemorrágicos endémicos de cada uno de los países mencionados y correspondientes al clado B (marcado en rojo) (Sarute y Ross, 2017).

Los mammarenavirus patogénicos para el hombre del OW son: virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) de distribución mundial, virus Lassa (LASV), virus Dandenong (DANV) y virus Lujo (LUJV). El virus LCMV es el único virus patogénico no hemorrágico (Saito et al., 2022).

Los virus patogénicos de esta familia son responsables de fiebres hemorrágicas que causan una mortalidad de alrededor del 30% (Gómez et al., 2011). Por este motivo representan un gran riesgo a la salud pública y son clasificados como agentes patogénicos con prioridad categoría A según el Instituto de la Salud de EEUU (Huang et al., 2015).

La mayoría de los mammarenavirus infecta roedores, cuya viremia e infecciones son de característica persistente y de baja patogenicidad. De esta forma los roedores son los reservorios naturales y los vectores responsables de las infecciones en humanos.

Solo en el caso del virus Tacaribe los murciélagos actúan como reservorio natural, aunque este virus no es patogénico para humanos.



**Figura 1. Distribución geográfica en América de Arenavirus del Nuevo Mundo.**

Mapa de las Américas que muestra la distribución de los arenavirus patogénicos y no patogénicos del Nuevo Mundo. Los nombres de los virus y los reservorios de huéspedes más frecuentes se indica entre paréntesis. En rojo se indica aquellos virus que generan síndromes febriles hemorrágicos endémicos, pertenecientes al clado B (Sarute y Ross, 2017).

## 1.2. Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA)

### 1.2.1. Reservorio y dispersión

Como se mencionó anteriormente el virus Junín, descubierto e identificado en el año 1958, es el agente etiológico de la FHA (Greenway et al., 1959). JUNV tiene como reservorio natural principal al roedor *Calomys musculus* (familia Muridae, subfamilia Sigmodontinae), comúnmente denominado ratón maicero. Su hábitat abarca las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y La Pampa. Estas regiones son, en consecuencia, las de mayor incidencia de la enfermedad (<https://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/calomys-musculus>).

JUNV genera infecciones persistentes y asintomáticas en su reservorio. La dispersión del virus entre roedores es a través de orina, heces y/o saliva. También existe contagio directo

debido a peleas agresivas entre machos adultos. La transmisión de madre a hijo, se produce a través de la leche materna y contribuye al mantenimiento del virus aún cuando el número de roedores en la población disminuye (Tapia-Ramírez et al., 2022).

La transmisión viral de roedores a humanos es a través de contacto directo, por ejemplo, a través de mordidas; o por contacto o inhalación de sus secreciones y excreciones. En la mayoría de los casos la infección en humanos se produce después de incursiones recreativas o laborales en entornos de hábitat natural para los roedores hospederos (Charrel y de Lamballerie, 2010).

### 1.2.2. Sintomatología

La FHA es una enfermedad viral aguda que en primera instancia presenta síntomas generales como fiebre, dolor de cabeza, debilidad, desgano, dolores articulares, oculares y pérdida de apetito (Gómez et al., 2011). El virus se replica en el sitio inicial de la infección, que generalmente son los pulmones. Luego se disemina hacia otros tejidos parenquimales, evolucionando rápidamente la enfermedad a formas más graves que se observan a partir del octavo o noveno día. Durante la segunda semana de la enfermedad comienza la mejoría en el 70 a 80% de los enfermos. En el 20-30% restante se presentan síntomas como, temblores marcados, incoordinación, ataxia, confusión mental, agitación, convulsiones, y manifestaciones neurológicas severas, hemorragias, shock, coma y muerte (<https://save.org.ar/wp-content/uploads/2022/06/Informe-FHA.pdf>).

### 1.2.3. Prevención y tratamiento

La FHA puede prevenirse mediante la vacuna Candid #1, que consiste en la administración de virus Junín atenuado. Esta vacuna desarrollada en EEUU hace más de 20 años por el CDC y en conjunto con investigadores argentinos, demostró ser inocua, inmunogénica y con un 95,5% de efectividad (Melcon et al., 2022).

La inmunización de la población en riesgo con Candid #1 comenzó a partir de 1991 y desde entonces se registró un notable descenso en los casos informados y asentados. Su aplicación es en personas sanas mayores de 15 años en una sola dosis en áreas endémicas y al menos un mes antes de que se realicen las actividades de riesgo.

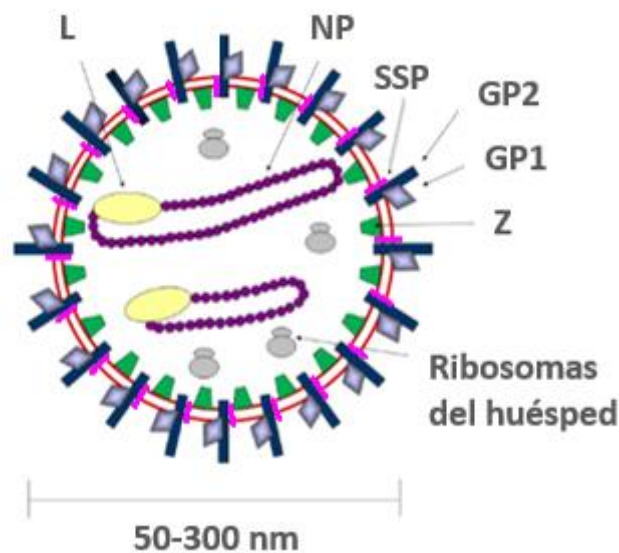
Para aquellas personas infectadas el tratamiento efectivo de la FHA consiste en la administración de plasma inmune específico (plasma de pacientes recuperados) en una dosis de 3.500 Unidades Terapéuticas (UT)/kg de peso y dentro de los primeros 8 días de la enfermedad.

## 1.3. Virus Junín

### 1.3.1. Estructura

Los viriones son pleomórficos, con un diámetro promedio de 50-300 nm y con envolturas lipídicas densas. Como se observa en la **Figura 2**, en la superficie del virión se encuentran proyecciones de 8 a 10 nm de largo correspondientes a las espículas. Las mismas están conformadas por heterotrímeros de las glicoproteínas virales maduras: Glicoproteína 1 (GP1), Glicoproteína 2 (GP2) y péptido señal (SSP). Estas glicoproteínas conforman el complejo glicoproteico (GPC) maduro.

Debajo de la envoltura lipídica se encuentra la proteína viral de matriz Z. En el interior de la partícula se localizan los complejos de ribonucleoproteína (RNP), compuestos por ARN viral de cadena simple asociado a la NP. A su vez, la RNP está asociada con la ARN polimerasa L dependiente de ARN. Estas partículas virales incluyen ribosomas del huésped, que frente al microscopio electrónico dan el aspecto "arenoso", del que proviene el prefijo "arena" de esta familia.



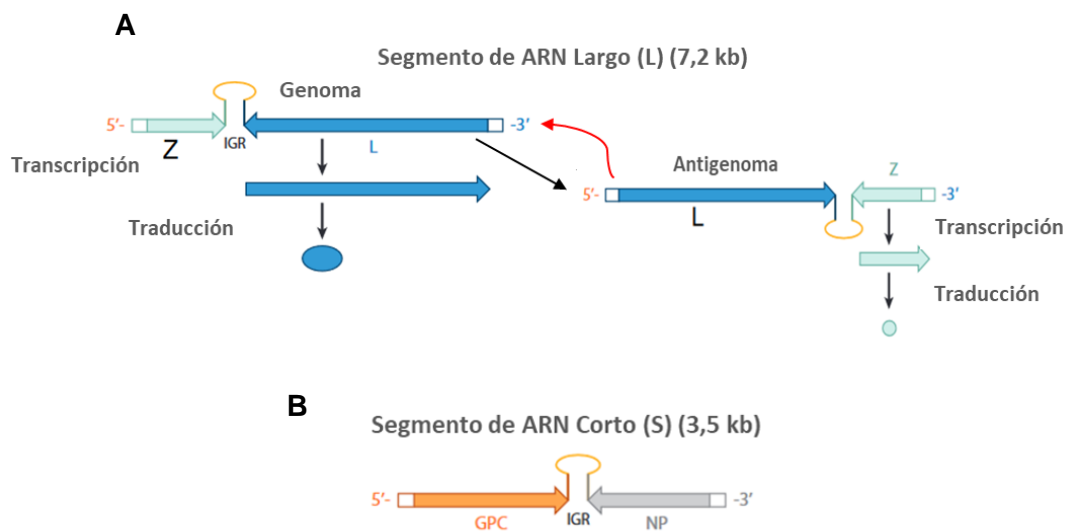
**Figura 2. Arenavirus: Estructura y tamaño del virión.**

Estructura general de la partícula de arenavirus. Las glicoproteínas virales maduras GP1 y GP2 (azul claro y azul oscuro respectivamente) están incorporados en la envoltura viral (en rojo), junto con el péptido señal SSP (rosa) y debajo la proteína de matriz Z (en verde). La NP se muestra en violeta y en amarillo la ARN polimerasa L dependiente de ARN. Ribosomas del huésped se muestran en gris. Extraído y modificado de Wolff et al., 2013.

### 1.3.2. Organización genómica

Como el resto de los mammarenavirus, JUNV tienen un genoma viral de ARN bisegmentado, simple cadena, de polaridad negativa y de codificación ambisentido. El genoma consiste en un segmento pequeño (S) de 3,5 kb y un segmento grande (L) de 7,2

kb. Como muestra la **Figura 3A** el segmento L codifica para la matriz (Z) y la polimerasa (L). La región intergénica (IGR) no codificante separa los dos marcos de lectura de polaridades opuestas del segmento, funciona como terminadora de la transcripción de los mensajeros subgenómicos virales y juega un rol importante en el ensamblado del genoma y la brotación viral (Pinschewer et al., 2005; Radoshitzky et al., 2015). La estrategia ambisentido para el segmento L consiste en la transcripción inicial de la ARN polimerasa ARN dependiente (L) (región de polaridad negativa). En la región IGR finaliza la transcripción y el mensajero se disocia para su posterior traducción cap-dependiente. Luego la polimerasa L actúa como replicasa y sintetiza el ARN antigenómico (ARNag) completo que permite la transcripción de Z y su traducción. A su vez este ARNag sirve como molde para la síntesis de nuevos genomas virales (flecha roja en la Figura).



**Figura 3. Genoma de Arenavirus.**

**A.** El segmento de ARN grande (L) codifica la matriz (Z) y la ARN polimerasa ARN dependiente (L). Se muestra el esquema para generar los ARNm para los ARN L y Z. A partir del genoma se sintetiza el antigenoma completo para la transcripción y traducción de Z. Y este sirve como molde para la síntesis de nuevo genoma (flecha roja). **B.** El segmento de ARN pequeño (S) codifica el precursor de glicoproteína (GPC) y la nucleoproteína (NP). Al igual que para la generación de los ARNm de L y Z ocurre un proceso similar para los ARN de NP y GPC, respectivamente. La región intergénica (IGR) entre los ARN controla tanto la transcripción como la traducción del ARN. Figura extraída y modificada de Sarute y Ross, 2017.

El segmento S codifica para el precursor (GPC) de las glicoproteínas y la nucleoproteína, con su correspondiente estructura terminadora IGR (**Figura 3B**). Con la misma estrategia descrita para el segmento L, en este caso primero se expresa NP y luego a partir del antigenoma se expresa GPC.

### 1.3.3. Ciclo de replicación

El ciclo de multiplicación se inicia con la interacción específica entre la proteína viral GP1 y el receptor de transferrina 1 (TfR1), tanto humano como del roedor hospedador. Varios



estudios demostraron que esta interacción principal ocurre en otros mammarenavirus patogénicos del NW, como por ejemplo MACV, causante de la fiebre hemorrágica Boliviana (Radoshitzky et al., 2007; Gallo et al., 2022).

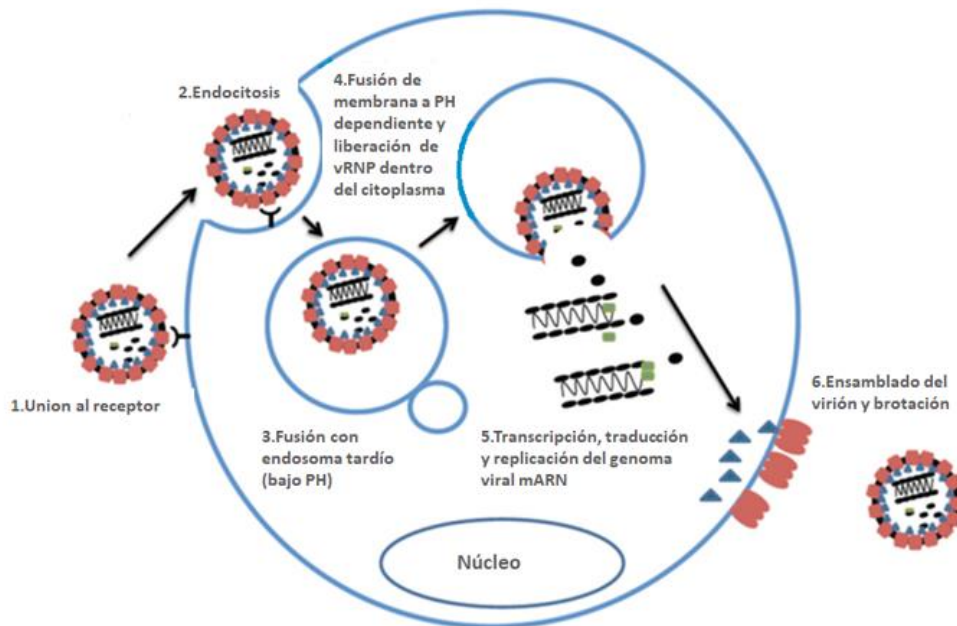
TfR1 es una proteína de membrana tipo 2 expresada como un homodímero en la membrana celular. En la célula hospedadora este receptor juega un papel central en el metabolismo celular del hierro, ya que, media la endocitosis de la Transferrina (Tf) unida a hierro. Su expresión está regulada según el estado del hierro celular, es decir, en estado de deficiencia del mismo, la expresión de TfR1 aumenta, mientras que, en exceso de hierro, la expresión de TfR1 disminuye. Se encuentra de forma abundante en células inmunitarias activadas, osteoblastos, eritroblastos, células cancerosas y tipos celulares involucrados críticamente en la patogénesis de arenavirus del NW (Kawabata, 2019).

También se ha demostrado que este virus utiliza otras moléculas de entrada, como el receptor de fosfatidilserina hTIM-1 (Inmunoglobulina de células T y dominio de mucina) (Jemielity et al., 2013); receptores de lectina tipo C: hDC-SIGN (molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas humanas -3) y hL-SIGN (no integrina de captura de ICAM-3 específica de hígado/nódulo linfático) (Martinez et al., 2013) y canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) (Gallo et al., 2022).

Luego de la unión al receptor, JUNV es internalizado a través de la vía endocítica mediada por clatrin. Estos resultados correlacionan con la interacción con el TfR1 y la vía de endocitosis de la Tf1 (Martinez et al., 2007). El complejo virus-receptor desencadena la entrada del virus por endocitosis formándose un endosoma temprano, conteniendo la partícula viral. El endosoma, que posee un pH de alrededor de 6.0, se asocia a un endosoma tardío cuyo pH es más ácido. Este pH, menor a 5.5, optimiza la disociación irreversible de GP1 de las subunidades SSP y GP2, por un cambio conformacional. La exposición de los dominios de fusión de GP2 que junto con SSP permite la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma tardío. Como se observa en la **Figura 4** frente al cambio de pH se produce el desnudamiento del virus liberando así las RNP al citoplasma. A continuación, se inicia la biosíntesis de macromoléculas. Como se mencionó anteriormente en la **Figura 3** la proteína L comienza la transcripción del segmento L y el gen NP. Y el aumento de NP permite el cambio de la polimerasa y la replicasa para moverse a través de IGR y generar cadenas completas de ARN<sub>g</sub>. A partir de esto se transcribe y traduce GPC y Z (Burri et al., 2012).

La glicoproteína viral GPC sigue la vía secretoria durante la cual se produce su procesamiento y maduración a subunidades GP1, GP2 y SSP. En el aparato de Golgi es glicosilada y transportada hacia la membrana plasmática (Lenz et al., 2001). El complejo GPC maduro se localiza específicamente en estructuras organizadas y ricas en colesterol denominadas balsas lipídicas (Cordo et al., 2013; Gaudin y Barteneva, 2015). Estas

plataformas representarían una estructura celular donde ocurre el ensamblado de las RNP con Z. La proteína de matriz Z dirige la maduración, permite la producción de partículas virales y la posterior brotación de las mismas (Shao et al., 2015).



**Figura 4. Ciclo de vida de Arenavirus.**

1. La entrada celular está mediada por diferentes receptores celulares (TfR1 para clado B de NW). Entrada de algunos virus (por ejemplo, LASV) también puede implicar un cambio dependiente del pH a un receptor intracelular ubicado en los lisosomas. 2. La captación de virus en las células está mediada por endocitosis (NW: dependiente de clatrina). 3. La fusión del virus ocurre con el endosoma tardío. 4. La RNP viral (vRNP) se libera en el citoplasma a través de un mecanismo de fusión de membrana dependiente del pH. 5. La replicación, transcripción y expresión de proteínas del genoma viral estrictamente ocurren en el citoplasma. 6. El ensamblaje y la gemación del virión ocurren en la membrana plasmática. Modificado de Shao et al., 2015.

## 2. Inmunidad innata

### 2.1. Respuesta celular a las infecciones virales

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra microorganismos. Para la activación de esta inmunidad las células poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El nivel de especificidad de los PRR es tan alto que dos PRRs distintos pueden distinguir partes de una misma molécula y no entrecruzar sus respuestas (Gersuk et al., 2006).

JUNV tiene como principales blancos, en humanos, las células dendríticas y macrófagos que son los principales productores de IFN (citoquinas) (Huang et al., 2015). A su vez, la infección de JUNV está asociada con altos niveles de IFN en casos graves y fatales.

In vitro los mammarenavirus del NW inducen la respuesta a Interferón tipo I (IFN I). Para contrarrestar este tipo de respuesta se ha demostrado que ciertas proteínas virales, como

NP, en el caso de JUNV, actúan de sustrato señuelo para la escisión de caspasas. De esta forma se inhibe la inducción de apoptosis en células infectadas (Wolff et al., 2013). En la mayoría de las infecciones virales, la interacción PAMP-PRR activa cascadas de señales que culmina con la fosforilación del factor regulador de IFN 3 (IRF3), activado por IPS-1, TRIF y/o STING. A su vez, IRF3 una vez fosforilado, transloca al núcleo donde induce la transcripción de los genes de IFN  $\alpha/\beta$ , con el objetivo de bloquear la actividad viral (Pryke et al., 2017). En el caso de JUNV se ha demostrado que NP funciona como antagonista del interferón a través de su capacidad para bloquear la inducción de IRF3 (Martínez-Sobrido et al., 2007). Además, proteínas células de restricción viral como PML han sido descritas durante la infección con el virus (Giovannoni et al., 2019). Según Peña Cárcamo et al., (2018) la proteína viperina presenta actividad antiviral contra JUNV e interacciona con la proteína viral NP. También se demostró para células infectadas con LCMV un aumento en la expresión de las proteínas VIP y PML (Djavani et al., 2001; Hinson et al., 2010).

La inmunidad innata intenta controlar la infección viral, a través de la respuesta de IFN I, sin embargo, esta debe tener una regulación muy fina. Teniendo en cuenta que la expresión de ciertas proteínas coordina el metabolismo celular a nivel de degradación de ARN, arresto traduccional y apoptosis; la prolongación en el tiempo de esta respuesta inflamatoria podría, conducir a enfermedades inflamatorias y patologías.

### 3. Ciclooxygenasas

#### 3.1. Función y localización

Dentro de la vía de respuesta inflamatoria celular, se encuentran las proteínas ciclooxygenasas (COX). Éstas son enzimas cruciales en la biosíntesis de las prostaglandinas (PGEs) y responsables de la producción del mediador ácido araquidónico (AA).

Existen dos isoformas: la ciclooxygenasa 1 (COX-1) y la ciclooxygenasa 2 (COX-2). Las PGEs producidas por ambas intervienen en funciones de mantenimiento como la citoprotección de la mucosa gástrica, la regulación del flujo sanguíneo renal y la agregación plaquetaria. COX-1 se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos y su principal localización es citoplasmática y en el retículo endoplasmático (RE) (Williams y DuBois, 1996).

La COX-2 es conocida por su función en la modulación positiva de la inflamación y los procesos de tumorigénesis. Se ha demostrado que la sobreexpresión de COX-2 puede facilitar el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la apoptosis celular y la promoción de la proliferación celular (Ramer et al., 2013).

COX-2 no se detecta en la mayoría de los tejidos normales. Su expresión es rápidamente inducida por múltiples estímulos como citoquinas proinflamatorias (IL1b, TNF $\alpha$ ),

lipopolisacáridos, mitógenos y oncogenes (ésteres de forbol); factores de crecimiento, hormonas (hormona luteinizante, LH) y diferentes agentes infecciosos. Esta inducción resulta en un aumento de la síntesis de PGEs en tejidos inflamados y neoplásicos. Así, la isoenzima inducible COX-2 se ha implicado en procesos patológicos como la inflamación y varios tipos de cáncer (Konturek et al., 2005).

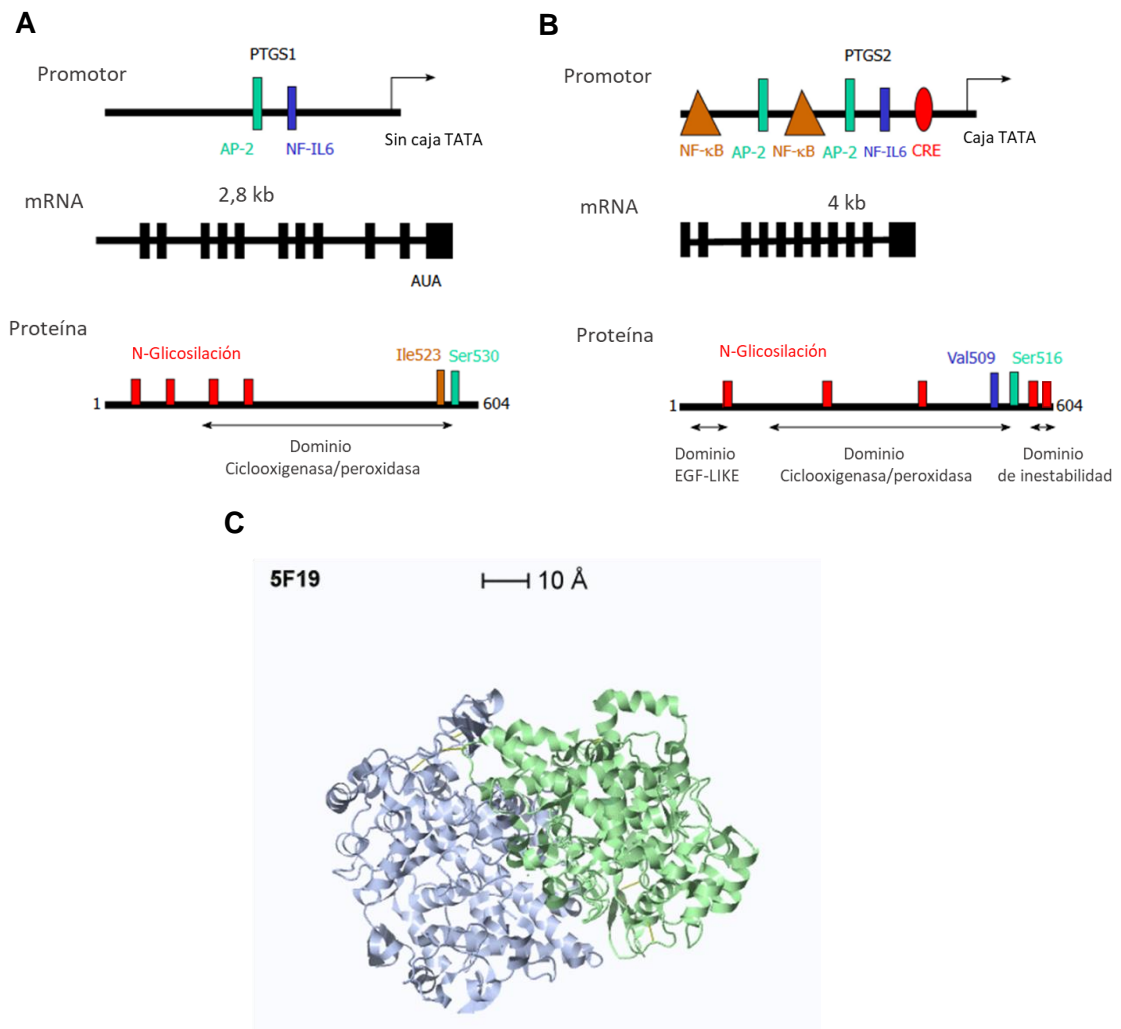
La proteína COX-2 se localiza principalmente en el lado luminal del RE y perinuclear (Chandrasekharan et al., 2004). Además otros trabajos reportaron su localización citoplasmática, en núcleo, cuerpos lipídicos, vesículas, estructuras filamentosas y mitocondria (Liou et al., 2005).

Recientemente se ha encontrado asociada a las *lipids droplets* (LDs), como parte de la respuesta pro-inflamatoria en la que pueden participar estas organelas (Carrossini et al., 2021).

### 3.2. Arquitectura génica y regulación de la expresión de COX

PTGS-1 (prostaglandina-endoperóxido sintasa), el gen de la isoenzima COX-1, es de 22.5 kb y codifica un ARNm de 2,8 kb relativamente estable. Como indica la **Figura 5** el control transcripcional de PTGS-1 se encuentra regulado principalmente por la proteína activadora-2 (AP-2) y el factor nuclear interleucina 6 (NF-IL6). Y a diferencia de COX-2 no posee una secuencia reguladora TATA, ya que su expresión es constitutiva. Por otra parte, PTGS-2, el gen de COX-2, es de 8 Kb que se activa por una amplia variedad de estímulos inflamatorios y proliferativos. Su ARNm es de 4 kb y se renueva rápidamente debido a la presencia de secuencias inestables en la región 3' no traducida (Rouzer y Marnett, 2003; Smith et al., 2000). Una variante de COX-1, la proteína COX-3, se produce mediante *splicing* alternativo del ARNm en humanos y se expresa como un transcrito de 5,2 kb. La única diferencia es la retención del intrón 1 del gen COX-1 en COX-3. Además de COX-3, se han identificado dos variantes más cortas sin actividad ciclooxigenasa, PCOX-1a y PCOX-1b, cuya función se desconoce (Schwab et al., 2003). COX-3 se encuentra de manera preferencial en la corteza cerebral y el corazón (Shaftel et al., 2003). Es una proteína de 65 kDa cuya actividad de ciclooxigenasa es alrededor de un 80 % más baja que la de la COX-1. Esto sugiere que la retención del intrón 1 puede modificar la conformación del sitio activo (Chandrasekharan et al., 2002).

PTGS-2 se regula principalmente a nivel de transcripción. La región promotora contiene varios elementos reguladores que confieren respuesta a factores de transcripción. Posee secuencias reguladoras específicas, característica particular de genes inducibles. En la **Figura 5B** se muestran las secuencias reguladoras: dos sitios AP-2, una caja TATA, dos sitios factor nuclear kappa B (NF-κB), elemento de respuesta cAMP (CRE) y NF-IL6, entre otros (Jaén et al., 2018).



**Figura 5. Comparación de la región promotora, la estructura del mensajero y la secuencia proteína COX-1 (A) y COX-2 (B). C. Imagen cristalográfica del homodímero de la proteína COX-2.**

**A y B.** El esquema muestra los principales factores de transcripción implicados en el control transcripcional de la PTGS. También el ARNm, donde se marca en cajas negras los axones y los motivos estructurales presentes en la proteína y relevantes para la actividad de la enzima. Las regiones de glicosilación de las proteínas (cajas rojas) tienen efectos sobre la actividad y el destino de la proteína, protegiéndolos de la degradación proteosomal. Extraído y modificado de Jaén et al., 2018. **C.** Cristalografía de la estructura de la proteína COX-2, en color se muestra cada monómero y arriba a la izquierda está el identificador de la misma (5F19). Extraído de Lucido et. al, 2016.

### 3.3. Estructura y actividad enzimática

Las COXs tienen un tamaño aproximado de 600 aminoácidos y tienen una estructura primaria similar (Garavito et al., 2002). Son homodímeros bifuncionales, como muestra la **Figura 5C** de COX-2. Cada monómero de COX-2 contiene un sitio activo de ciclooxigenasa y peroxidasa separado, que están unidos funcionalmente por un puente hemo. Son proteínas de membrana monotípicas (insertadas en un solo lado de la membrana) y parecen estar dirigidas a la membrana luminal del retículo endoplásmico, donde están N-glicosiladas.

Están muy conservadas y entre las COX de diferentes especies se observan pocas diferencias en los dominios de dimerización, unión a la membrana y catalíticos. Específicamente, entre COX-1 y 2 de la misma especie hay una identidad de secuencia del 60 % al 65 % y una identidad del 85 % al 90 % entre isoformas individuales de especies diferentes (Smith et al., 2000).

Como se observa en la **Figura 5A y B** las COXs son proteínas glicosiladas y acetiladas, aunque no en los mismos sitios. Ambas enzimas exhiben un dominio catalítico que contiene los sitios activos de peroxidasa y ciclooxigenasa. Para COX-1 se muestran los sitios puntuales de acetilación (Ser530, Ile523) que impiden la actividad completa de la enzima. Estas son las clásicas acetilaciones farmacológicas que produce la aspirina, inhibiendo en consecuencia la actividad enzimática de las COXs (Lucido et al., 2016). También posee cuatro sitios potenciales de glicosilación en los residuos Asn 68, Asn 104, Asn 144 y Asn 410. Se ha demostrado que Asn 68, Asn 144 y Asn 410 están glicosilados y el cuarto sitio, Asn 104, no lo está (Nemeth et al., 2001).

Como muestra la **Figura 5B** la proteína COX-2 está conformada por un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) con función de dimerización; el dominio catalítico (ciclooxigenasa/peroxidasa) y un dominio de inestabilidad. Además, posee un péptido señal hidrofóbico amino terminal y un dominio de unión a membrana (Chandrasekharan et al., 2004).

Como se mencionó para COX-1, COX-2 posee regiones de acetilación farmacológica (Ser516 y Val509) que permiten la inactivación por medio de la aspirina. Se ha descrito cinco sitios potenciales de N-glicosilación dentro de la estructura de COX-2 (Asn53, Asn130, Asn396, Asn580 y Asn592); dos de los cuales están siempre glicosilados (Asn53, Asn130). Los aminoácidos Asn396 y Asn580 pueden estar total o parcialmente glicosilados. Se demostró que estas glicosilaciones poseen alto contenido de manosa y que los tres primeros sitios son necesarios para un plegamiento adecuado de la enzima (Nemeth et al., 2001).

Según Sevigny et al.(2006) la glicosilación en el residuo Asn580 afecta la actividad de la COX-2 al controlar el reemplazo de la enzima. Por otra parte, el quinto sitio (Asn592) nunca esta glicosilado. Esto permite explicar los diferentes pesos moleculares de la proteína según su glicosilación y por ende la activación parcial o completa.

Estudios demostraron que, frente a ciertos estímulos, como por ejemplo SIN-1 (3-morfolinosidnonimina), se pueden inducir diferentes estados de glicosilación de la enzima correspondientes a 72, 70, 68 y 66 kDa, dando como resultado la expresión de una proteoforma hipoglicosilada inactiva de COX-2. A su vez, en exposiciones prolongadas al estímulo se produce mayoritariamente la síntesis *de novo* de esta forma inactiva, afectando las vías río debajo de la ruta metabólica de PGEs y AA (**Figura 6**). De esta forma la

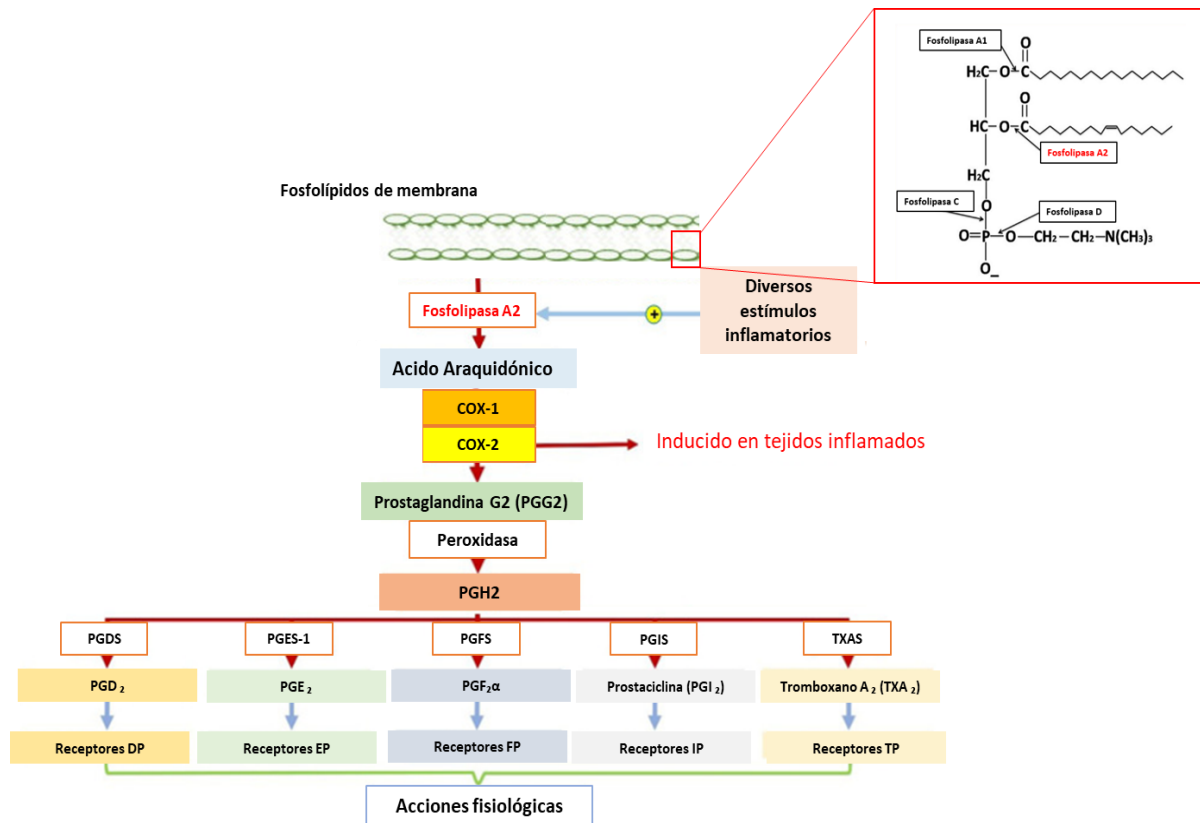
hipoglucosilación representa un mecanismo alternativo para impedir la actividad de COX-2 en varias enfermedades, y se ha propuesto como terapia alternativa (Eligini et al., 2021).

Por otra parte y según Raman et al.(2018), el palmitato afecta la expresión a favor de la glicofoma completamente activada de COX-2, al igual que, el aumento en la producción de la prostaglandina E2. El aumento de los niveles de COX-2 es de forma dependiente de la dosis del palmitato. Estos resultados muestran la regulación de la actividad enzimática de COX-2 a través de la modificación post-traducciona con este ácido graso.

### 3.4. Producción de prostaglandinas

La vía metabólica de PGEs se observa en la **Figura 6** y comienza con la liberación de AA de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Esta liberación la lleva a cabo la fosfolipasa A2 (PLA2) que actúa en la posición sn-2 del esqueleto de fosfolípidos (El-Malah et al., 2022; Tyagi et al., 2020). Una vez que se libera AA se metaboliza aún más mediante procesos enzimáticos o no enzimáticos. Un ejemplo de los procesos no enzimáticos es la autooxidación del ácido araquidónico por especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). En los procesos enzimáticos que puede sufrir AA se encuentran cuatro vías posibles: ciclooxigenasa, lipoxigenasa, citocromo p450 (CYP 450) y vías de anandamida. En la vía de la ciclooxigenasa participan COX-1 y COX-2 (Hanna y Hafez, 2018). El sitio activo de las enzimas acepta el ácido araquidónico y lo oxigena para producir el intermediario prostaglandina G2 (PGG2), un compuesto inestable. Rápidamente PGG2 se une y modifica dentro del sitio activo de la peroxidasa para formar el producto final, prostaglandina H2 (PGH2) (Smith et al., 1991). Por lo tanto, la producción de PGH2 es una reacción de dos pasos y que pueden llevar a cabo ambas ciclooxigenasas.

A raíz de PGH2, durante la inflamación, se producen cuatro isómeros de prostaglandinas bioactivas principales, prostaglandina E2 (PGE2), prostaciclina I2 (PGI2), prostaglandina D2 (PGD2), F2a (PGF2a) junto con un tromboxano A2 (TXA2). Estos se producen a través de la bioconversión de PG y TXA2 sintasas mediante reacciones de isomerización y oxidación o reducción aguas abajo. Como, por ejemplo, prostaglandina D2 sintasa (PGD2S) o prostaglandina E sintasa-1 (PGES-1), entre otras (ver **Figura 6**). Su nivel de producción depende principalmente de la expresión de COXs en tejidos inflamatorios, especialmente COX-2.



**Figura 6. Biosíntesis de prostaglandinas y compuestos asociados.**

El ácido araquidónico se libera por estimulación de Ca<sup>2+</sup> mediada por diversos estímulos inflamatorios o por fosforilación de la fosfolipasa A2 del fosfolípido de membrana. Las enzimas ciclooxigenasas (tanto COX-1 como COX-2) epoxigenan el ácido araquidónico en prostaglandina G2 (PGG<sub>2</sub>), que luego se convierte en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) con la ayuda de la enzima peroxidasa. Después de esto, PGH<sub>2</sub> se convierte en análogos de prostaglandina (PG) (es decir, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α y PGI<sub>2</sub> o prostaciclina) y tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) con la ayuda de isomerasas y sintasas, respectivamente. Las PG formadas y los compuestos asociados son capaces de desencadenar una miríada de eventos de señalización mediante la activación de sus respectivos receptores de membrana ubicados en el sitio de producción. Adaptado de El-Malah et al., 2022 y Tyagi et al., 2020.

Las PG son compuestos lipídicos similares a las hormonas y están involucrados en muchas reacciones fisiológicas. Las PG tienen una vida corta in vivo (con vidas medias de segundos a minutos) y actúan de forma autocrina o paracrina, en lugar de endocrina (Chandrasekharan et al., 2004). Juegan un papel clave en la generación de respuestas inflamatorias mediante la activación de sus respectivos receptores de membrana ubicados en el sitio de producción. Estos receptores se denominan DP1-2, EP1-4, FP, IP, y TP, que hace referencia al receptor que enlaza la correspondiente prostaglandina (por ejemplo, los DP1-2 se unen a los receptores de PGD<sub>2</sub>). Entre ellos, la PGE<sub>2</sub> es la prostaglandina que induce los síntomas típicos de la inflamación, como dolor, fiebre, tumor y reacción anafiláctica (Ju et al., 2022).



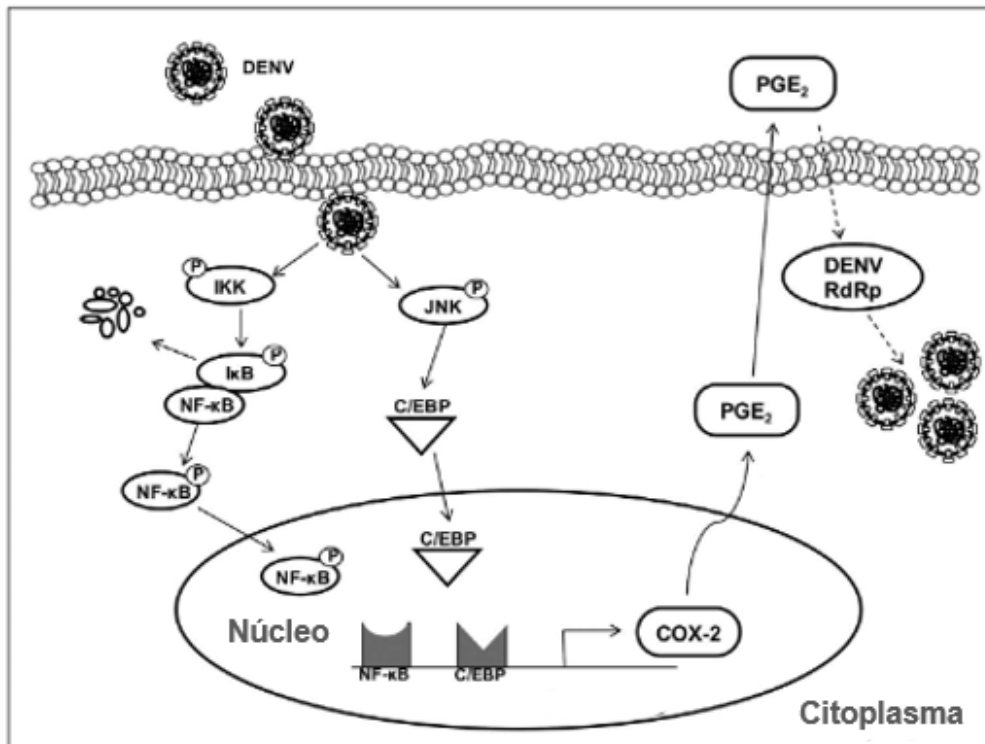
### 3.5. COX-2 en el contexto de infecciones virales

Se ha visto que, en estudios comparativos, ciertas cepas virales inducen en mayor medida los niveles de ARNm de COX-2. Un ejemplo de esto se observa en los genotipos del virus de la Hepatitis C (HCV). Según Jahan et al. (2011) los niveles de ARNm de COX-2 fueron significativamente mayores en pacientes infectados con el genotipo HCV 3a versus genotipo HCV 1a. Para Chen et al. (2015) HCV permite el aumento en la producción de IL-8, que lleva a la expresión de COX-2 a través de la activación de la vía MAPK (ERK y JNK). A su vez, ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre la replicación del virus a través de la expresión de COX-2 mediada por IL-8.

Otros estudios han mostrado que los incrementos en COX-2 y PGE2 modulan de manera positiva la replicación del Citomegalovirus (Zhu et al., 2002), Gammaherpesvirus (Gandhi et al., 2017), Parainfluenza (Lewandnmska-Polak et al., 2019) y el virus de Newcastle (Wang et al., 2020). Para el virus de la Hepatitis B se demostró que sus proteínas virales regulan la expresión de la enzima COX-2 a nivel de la activación del promotor de este gen, generando así un aumento en la expresión de la enzima y mostrando una actividad pro-viral de la misma. Esta interacción es de manera directa entre la proteína no estructural HBx del virus y C/EBP $\beta$  (Yue et al., 2011).

El aumento de la expresión de COX-2 es una característica común a los cánceres asociados con las infecciones por el virus de Epstein-Barr(EBV) y Herpes virus (KSHV) (Shelby et al., 2005). Lamentablemente para la gran mayoría de los casos en los que se ha sugerido una actividad pro-viral de COX-2 el mecanismo no ha sido clarificado. En el caso del virus dengue (DENV) se ha observado que la expresión de COX-2 aumentó en pacientes infectados. Este mismo aumento se determinó in vitro, en células de hepatoma humano Huh-7. Estos resultados, junto con otros, llevaron a la propuesta de que la inducción de COX-2 podría facilitar la propagación del serotipo 2 de DENV (DENV-2). En este caso se demostró la inducción de la actividad de la polimerasa de DENV-2 por PGE2 como mecanismo responsable de la actividad pro-viral. En la **Figura 7** se muestra el modelo propuesto.

La infección por DENV-2 induce la expresión de COX-2 a través de la activación de las vías de señalización de la CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP) y mediadas por NF- $\kappa$ B y las quinasas MAP, IK e JN (MAPK/IKK/JNK). Luego, el NF- $\kappa$ B fosforilado y el C/EBP activado se trasladan al núcleo y se unen a la región promotora de COX-2. Como se mencionó anteriormente la inducción de COX-2 y la producción elevada de PGE2 por infección con DENV-2 conducen a una mayor actividad de la polimerasa viral (DENVRdRp) y la propagación viral. El mecanismo involucra la estabilización de complejo polimerasa-ARN (Lin et al., 2017).



**Figura 7. Modelo propuesto para ilustrar el mecanismo de aumento de la expresión de COX-2 y la producción de PGE2 durante la infección por DENV.**

Activación de las vías de señalización de C/EBP y MAPK/JNK que llevan a la activación del promotor de COX-2 y su posterior expresión. Como consecuencia aumenta la expresión de PGE2 y la actividad de la ARN polimerasa RNA dependiente de DENV. Extraído y modificado de Lin et al., 2017.

Por otra parte, esto mismo no se observó en otra línea celular, como A549, lo que resultados podrían deberse a diferentes efectos de PGE2 en la replicación de DENV en diferentes tipos de células (Liou et al., 2008).

Los resultados de Lin et al. (2007) se relacionan con lo encontrado en células deficientes en una quinasa no depresible de control general 2 (GCN2). En ellas se desencadena la producción mejorada de COX-2/PGE2, lo que conlleva a una mayor replicación de DENV-2 y rendimiento viral en los sobrenadantes de cultivo en comparación con las células WT infectadas con DENV. Por otra parte, la sobreexpresión/activación de GCN2 contiene efectivamente la infección por DENV al inhibir la señalización de COX-2/PGE2 (Afroz et al., 2020).

COX-2 es también una enzima estimulada durante la infección con SARS-CoV y SARS-CoV-2, vía su proteína S y nucleocápside. Se ha propuesto que la inducción de COX-2 jugaría un rol importante en la regulación del daño e inflamación de pulmones e hígado en pacientes con COVID-19 (Chen et al., 2021; Ong et al., 2020; Yan et al., 2006), aunque aún no se ha determinado su rol específico.

Para el caso de los mamarenavirus un único trabajo reportó la regulación negativa del mensajero de PTGS-2 por la cepa virulenta LCMV-WE, al comparar con controles sin infectar. Los autores encontraron que la cepa no virulenta LCMV-Arm indujo la expresión del ARNm de COX-2, aunque no se realizaron estudios para determinar la presencia de esta enzima en células polimorfonucleares de animales infectados (Djavani et al., 2007).

### 3.6. Intervención farmacológica de COX-2 (Inhibidores de COX-2)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o también conocidos como NSAIDs por sus siglas en inglés, son inhibidores competitivos de las COXs.

En particular, los AINE tradicionales no selectivos, como la aspirina y naproxeno producen una supresión de COX-1 mayor al 95 %, aunque también inhiben a COX-2. Esto ocurre por medio de la acetilación de la Ser-530 dentro del sitio activo de la ciclooxigenasa. La acetilación de COX-1 conduce a una pérdida completa de actividad, mientras que la acetilación de COX-2 da como resultado la generación del producto monooxigenado ácido 15 (R) -hidroxieicosatetraenoico (15R-HETE), el cual no puede ser convertido en PGs (Lucido et al., 2016).

Estos inhibidores muestran efectos cardiovasculares adversos y frente a esto, se han desarrollado inhibidores AINE selectivos de COX-2 más seguros y con un perfil de seguridad gástrica mejorado (Ritter et al., 2009). Celecoxib, un inhibidor selectivo, mostró una inhibición mejorada con una concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de 91 nmol/l en la producción de PGE<sub>2</sub> mediada por COX-2, en fibroblastos dérmicos humanos; mientras que fue un inhibidor débil de la producción de PGE<sub>2</sub> mediada por COX-1 en células de linfoma humano (IC<sub>50</sub> = 2800nmol/l) (Yoshino et al., 2011). In vitro también se demostró su IC<sub>50</sub> de 0.045 µM y su índice de selectividad (IS): 327 (El-Miligy et al., 2023).

La interacción de los inhibidores selectivos con COX-2 puede diferir. Por ejemplo, dentro de la familia de inhibidores Coxib, Lumiracoxib tiene una estructura química distinta de otros inhibidores selectivos de la COX-2. Se une e interactúa con esta enzima a través de mecanismos diferentes a otros inhibidores. Específicamente, el grupo carboxilato de Lumiracoxib forma enlaces de hidrógeno con el catalizador Tyr385 y con Ser530 en COX-2. Mientras que celecoxib interacciona con el bolsillo lateral hidrofóbico más grande de COX-2 (Esser et al., 2005).

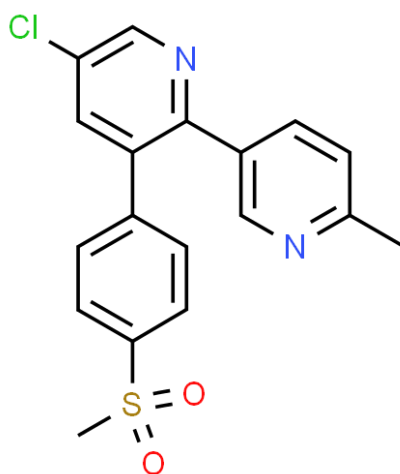
Se demostró que los inhibidores AINE selectivos de COX-2 tienen un efecto antiviral frente a virus inductores de la enzima. Por ejemplo, para el virus de la influenza aviar A (H5N1), se demostró que presenta efecto antiviral directo en los macrófagos humanos infectados, disminuyendo la producción de partículas infecciosas (Lee et al., 2011). Para el virus del herpes simple (HSV) (Gebhardt et al., 2005), se demostró que la inhibición específica de

COX-2 resulta en la disminución de virus infeccioso. También en estos trabajos se ha sugerido la terapia combinada con drogas antivirales como aciclovir e inhibidores AINEs.

En abril de 2021 se demostró por primera vez que SARS-CoV-2 induce la expresión de COX-2 en líneas celulares, cultivos epiteliales primarios y ratones (Chen et al., 2021). Si bien ya se había sugerido para el tratamiento de COVID-19 el uso de inhibidores de COX-2 (Baghaki et al., 2020), posteriormente se demostró que tanto meloxicam como celecoxib no son capaces de inhibir la replicación de SARS-CoV-2 in vitro (Chen et al., 2021; Terrier et al., 2021).

### 3.7. Antecedentes de Etoricoxib

Etoricoxib (ETO) es un inhibidor AINE selectivo de COX-2. Tiene un peso molecular de 358.84 g/mol y es una droga lipofílica de administración oral para tratar condiciones inflamatorias como la artritis reumatoide, la osteoartritis, el dolor musculo esquelético y el dolor menstrual. Su estructura química consiste en un anillo de furanona sustituido con un anillo de piridina (**Figura 8**). ETO es parte de la familia Coxib, que incluye otros compuestos relacionados como celecoxib, lumiracoxib, valdecoxib y rofecoxib.

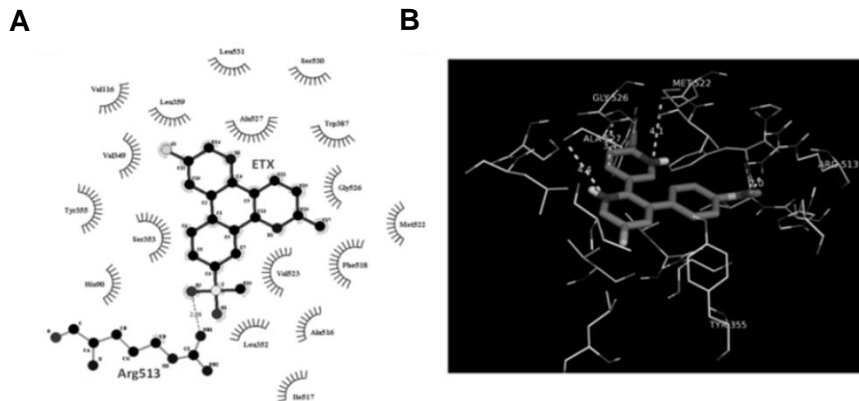


**Figura 8. Estructura química de Etoricoxib.**

Su nombre (IUPAC) sistemático: 5-cloro-6'-metil-3-[4-(metilsulfonyl)fenil]-2,3'-bipiridina. Extraído de la pagina <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.110209.html?rid=98daa64c-b2c1-476c-b3e3-7b0845fc6e23>

Sadasivam et al. (2020) demostraron que ETO posee una mayor actividad química en fases de agua y etanol, en comparación de la fase gaseosa. Esto sugiere una actividad de la droga mayor en solventes biológicos como sangre, tejidos o regiones donde se encuentra COX-2. Este trabajo también reportó la posible interacción de ETO con 18 residuos aminoacídicos dentro del sitio activo de COX-2 (**Figura 9**). Otro artículo determinó que la inhibición de COX-2 por ETO es dependiente del tiempo y reversible (naturaleza no

covalente). Además, muestra una eficacia similar a la de los AINE tradicionales en varios modelos de inflamación, dolor y fiebre en roedores (Riendeau et al., 2001).



**Figura 9. Imagen representativa de la interacción de COX-2 con ETO.**

**A.** Representación en 2D de ETO interaccionando con los 18 residuos aminoacídicos dentro del sitio activo de COX-2. **B.** Representación en 3D de la interacción donde COX-2 se representa con líneas y ETO en formato de tubos. Extraído de Sadasivam et al. (2020)

Otros trabajos reportaron que la administración de ETO posee actividad ansiolítica, reduce los niveles de corticosterona e inhibe la neuroinflamación mediante la supresión de la neurodegeneración asociada a la expresión de COX-2 (Sil y Ghosh, 2016). ETO también muestra un efecto anticancerígeno a través de su modulación antioxidante, antiinflamatoria y de la señalización del factor nuclear NF- $\kappa$ B, COX-2 y PGE2 (Ali et al., 2022).

Con respecto a infecciones virales se observó que ETO no tiene efecto en la entrada ni en la replicación viral de SARS-CoV-2, en el rango de 0 a 100  $\mu$ M (de Bruin et al., 2022).

# Objetivos e hipótesis

---

# 1. Hipótesis

La infección con JUNV estimula la expresión de la ciclooxigenasa 2.

## 2. Objetivo general

Analizar la expresión de COX-2 en cultivos infectados y sin infectar con JUNV, utilizando líneas celulares humanas.

### 2.1. Objetivos específicos

1. Estudiar la expresión de la proteína COX-2 en células infectadas con JUNV.
2. Analizar el fenotipo de expresión de COX-2 en células infectadas.
3. Estudiar el rol de COX-2 durante la multiplicación viral.

# Materiales y métodos

---



## 1. Cultivos celulares

### **Línea celular A549 (ATCC CRM-CCL-185™)**

Línea celular epitelial proveniente de carcinoma de pulmón humano (*Homo sapiens*). Los cultivos crecieron en MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (SFB) y 50 µg/ml de gentamicina. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>.

### **Línea celular Vero (ATCC CCL 81™)**

Línea celular proveniente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecusaethiops*). Los cultivos crecieron en MEM con adición de 5% de suero de ternera inactivado (ST) y 50 µg/ml de gentamicina. Los cultivos se mantuvieron en estufa cerrada a 37° C sin CO<sub>2</sub>.

### **Línea celular Huh-7 (JCRB 0403)**

Línea celular proveniente de carcinoma de hígado humano (*Homo sapiens*). Los cultivos crecieron en MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB) y 50 µg/ml de gentamicina. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37° C con 4% de CO<sub>2</sub>.

## 2. Obtención de stocks de virus Junín (JUNV)

Se utilizó la cepa atenuada IV4454 de JUNV aislada a partir de un caso leve de fiebre hemorrágica argentina (Contigiani, 1977). La amplificación de la semilla se realizó por medio de la infección de células Vero en una botella T75 con una confluencia del 80% aproximadamente. Luego de agregar el inoculo (1.5 ml) se incubó en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> por una hora. Pasada la hora de adsorción se retiró el inóculo y completó con 15 ml de medio de mantenimiento MEM suplementado con 1,5% de ST. La incubación se realizó en estufa a 37° C con CO<sub>2</sub> por 6 días. Se cosechó el sobrenadante a los 3, 4, 5, 6 y 7 días post-infección (p.i.) y para determinar producción viral en los mismos se titularon por el método de Unidades Formadoras de Placas (UFP) en células Vero. Los sobrenadantes del stock fueron posteriormente alicuotados y almacenados a -80°C.

## 3. Titulación con el Método de Unidades Formadoras de Placas (UFP)

En microplacas de 24 cavidades se crecieron monocapas de células Vero e infectaron, por duplicado, con un inóculo de 0,1 ml de diluciones seriadas al décimo de la muestra a titular. Las diluciones de las diferentes muestras se realizaron con MEM 1,5% de Suero Fetal

Bovino (SFB). Luego se incubó una hora a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>, posteriormente se retiró el inoculo y colocó 1 ml de medio semisólido, correspondiendo a una mezcla de partes iguales de metilcelulosa 1,4% y MEM 2X, en cada cavidad. Las monocapas infectadas se incubaron por siete días en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub>. Pasado esos días, se fijaron los pocillos con 0,5 ml de Formol 10% en agua, durante 30 minutos y se revelaron las placas con una solución de cristal violeta 1% en etanol. Se calculó el título viral por medio del conteo de placas de lisis en la dilución correspondiente. El título viral expresado en UFP por mililitro se determinó de la siguiente forma:

Título (UFP/ml) = n° promedio de placas / (volumen del inóculo x dilución utilizada).

#### 4. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para este ensayo se cultivaron monocapas de células en vidrios estériles y colocados en pocillos de 24 cavidades. Se infectaron con virus Junín (JUNV) a una MOI: 0,1 a distintos tiempos p.i. se lavaron tres veces con PBS por 5 minutos y se fijaron con para-formaldehído (PFA) 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de ese tiempo, se retiró el PFA, lavó con PBS tres veces y dejó secar. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización.

Posteriormente cada pocillo fue permeabilizado con 0,2 ml de 0,1% de solución de tritón X-100 en PBS por 10 minutos en agitación. Luego de los tres lavados con PBS, los vidrios se sacaron de las microplacas y colocaron en cámara húmeda y se incubaron con 30 µl de las diluciones de anticuerpos correspondientes.

Para la marcación de las proteínas virales los cubreobjetos se incubaron invertidos con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-NP (*beiresources*, SA02-BG12, N°cat: NR-2573) en una dilución de 1/300 durante 1 hora a 37° C. A continuación, se realizaron tres lavados adicionales con PBS por 10 minutos y pasado ese tiempo se incubó con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-COX-2 (Ab52237) en una dilución 1/100 durante 1 hora a 37° C. Luego, las muestras se lavaron con PBS por 10 minutos y posteriormente los vidrios se incubaron invertidos con 25µl de una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados. Se utilizó una dilución 1/200 para marcar proteínas virales y COX-2. Esta mezcla de anticuerpos secundarios se realizó por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Luego del lavado con PBS se trató por 5 minutos con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2 fenilindol (DAPI) a 37°C, se continuó con 2 lavados con PBS.

Para el montaje, los vidrios se colocaron invertidos sobre portaobjetos utilizando 3µl de 2,5% de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO-Sigma) en glicerina tamponada y fueron sellados con esmalte transparente.

Se realizaron controles de vidrios sin infectar y tratados con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), que estimula la expresión de la enzima COX-2, como control positivo. Por último, los preparados se observaron y registraron por microscopia invertida de epifluorescencia (microscopio Olympus IX71). El análisis de imágenes se realizó a través del software Fiji.

## 5. Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARN se sembraron células A549 en microplacas de 6 cavidades y se infectaron con virus Junín (IV 4454) a una MOI= 0,1 UFP/célula. Pasadas las 24 horas p.i. se lavaron las monocapas celulares con PBS y se levantó cada dos pocillos con 300µl de TRIzol. Las muestras se mezclaron bien e incubaron 5 minutos a 30°C. Luego se agregaron 400 µl de cloroformo a cada una de las muestras, se agitó vigorosamente, se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa superior y transfirió a tubos Eppendorfs nuevos. Se adicionó 1 volumen de isopropanol, se mezcló por inversión e incubó a -80°C durante 30 minutos. Pasados los mismos, se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Luego, se descartó el sobrenadante, lavó el pellet con etanol 70% y se dejó secar. A posteriori se resuspendió el pellet en una dilución de 10µl de acetato de sodio 3 M, 250 µl de etanol 100% y 90 µl de agua libre de RNAsas. Se incubó a -80°C durante 30 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Luego de retirar el sobrenadante, se lavó el pellet con etanol 70% y se dejó secar. Finalmente, se disolvió el pellet en 20 µl de agua bidestilada estéril libre de RNAsas. Se cuantificó la cantidad de RNA total en cada muestra con el Nanodrop y se evaluó la pureza de las muestras por medio de la relación de absorbancias. En una relación de absorbancia de 260/280 que se encuentra entre valores de 2.0-2.2 se considera indicativo de un ARN de pureza óptima. Mientras que la relación de absorbancia 260/230 es indicativo de contaminación con sales, carbohidratos y fenoles, valores mayores a 1,8 indican ARN sin contaminación. Posteriormente las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior uso. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

<b>Muestra</b>	<b>[ng/µl]</b>	<b>A 260/280</b>	<b>A260/230</b>
<b>A549 24 h p.i.</b>	787,3	2,12	1,86
<b>A549 24 h control</b>	473,6	2,01	2,14

**Tabla 1. Concentración de ARN total para PCR.**

Luego de la extracción de las muestras se midió su concentración en nanogramos/ microlitro para su posterior síntesis a cDNA y análisis por RT-PCR. En la tabla también se muestra la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 que se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

Para la síntesis de cDNA, por medio de diluciones correspondientes, se equipararon las concentraciones ng/μl de ambas muestras de ARN. Se tomaron 4 μl de cada una de ellas y mezclaron con 1,2 μl de oligonucleótidos aleatorios (Biodynamics) y cantidad suficiente de agua bidestilada para llegar a 10 μl. Se incubó por 5 minutos a 70°C y por 5 minutos adicionales en hielo. Luego, a cada muestra se agregaron 10μl de mezcla de reacción que contenía: 1 μl de transcriptasa reversa M-MLV (100U/μl, Promega), 4 μl de buffer 5X, 1μl de inhibidor de RNAsas (RNasin, Promega) y 1 μl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato 10mM (Promega) y cantidad suficiente de agua bidestilada. Finalmente, las mezclas resultantes se incubaron a 42°C durante 2 horas.

Para realizar la PCR en tiempo real (RT-PCR), por cada muestra a amplificar se utilizaron 12,5 μl de una mezcla comercial concentrada para RT-PCR (Roche) que posee Taq DNA polimerasa, desoxirribonucleótidos-trifosfatos, Mg<sup>2+</sup>, buffer y SYBR Green. Además, se le agregó 0,4 μl de cebadores sentido 50 μM, 0,4 μl de cebadores antisentido 50μM, 8,7μl de agua libre de nucleasas y 3μl de cDNA.

Protocolo de amplificación: un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos; 45 ciclos de 45 segundos a 95°C, 60 segundos a 43°C, 45 segundos a 72°C, un ciclo de 5 minutos a 72°C y uno de 81 repeticiones a 7 segundos a 55-95°C (curva de disociación o *melting curve*).

En el caso de la amplificación de los mensajeros de COX-1 y COX-2 se optimizó la RT-PCR. La temperatura de *annealing* de los *primers* utilizados se determinó realizando la amplificación con un gradiente de temperatura que abarcaba desde 43°C a 55°C. Esta puesta a punto dio como resultado una temperatura óptima para COX-1 de 53°C y para COX-2 de 47°C.

Por medio del programa BioRad iQ5, se obtuvieron las curvas de amplificación, de disociación y los valores de CT, que se utilizó para calcular los niveles de expresión relativos de los genes de interés.

Según las siguientes ecuaciones:

$$\Delta CT = CT (N) - CT (\text{actina})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{condición infectado}) - \Delta CT (\text{condición sin infectar})$$

$$\text{Tasa de incremento o expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Siendo CT: número de ciclo para el cuál se alcanza el umbral de fluorescencia definido.  
ΔCT: diferencia entre el promedio de los valores de CT de las muestras utilizando cebadores para amplificar el gen de interés y los valores de CT utilizando cebadores para amplificar actina.

$\Delta\Delta CT$ : diferencia entre el valor de  $\Delta CT$  en la condición infectado (células infectadas con JUNV-IV) y el valor de  $\Delta CT$  en una condición de referencia (células sin infectar).

Un valor relativo igual a 1 indica que no hay diferencias en las muestras respecto al control. A su vez, se tomó como valores de corte 0,5 y 2 que representan, respectivamente, el número de veces en los que la expresión del gen en estudio se encuentra inhibida o aumentada respecto al control.

Los cebadores utilizados en el trabajo se detallan en la **Tabla 2**. En todos los casos, se emplearon un par de oligonucleótidos para la amplificación de actina como referencia.

<b>Primer</b>	<b>Orientación</b>	<b>Secuencia</b>
NP	Sentido	5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3'
NP	Antisentido	5'-GGCATCCTTCAGAACATC-3'
Ciclooxigenasa-1	Sentido	5'-AGTACCGCAAGAGGTTTGGC-3'
Ciclooxigenasa-1	Antisentido	5'-GCCGTCTTGACAATGTTAAAGC-3'
Ciclooxigenasa-2	Sentido	5'-GAATCATTACCAGGCAAATTG-3'
Ciclooxigenasa-2	Antisentido	5'-TCTGTA CTGCGGGTGGAAACA-3'
Actina	Sentido	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'
Actina	Antisentido	5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'

**Tabla 2.** Datos de los cebadores, su orientación y secuencia utilizados.

## 6. Western Blot

En una placa de 24 cavidades se sembraron células A549. Una vez formadas las monocapas se retiró el medio y trató con 0,1  $\mu M$  de PMA por 4 horas. Luego se levantaron las muestras con 75  $\mu l$  de buffer SDS-PAGE cada dos pocillos, colocaron en Eppendorfs y almacenaron a  $-80^{\circ}C$ . Para el inmunoblot, las muestras se calentaron a  $100^{\circ}C$  por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y posteriormente fueron separadas por SDS-PAGE en geles de acrilamida 10%. La electrotransferencia se realizó en semi-húmedo a una membrana de PVDF (polyvinylidenedifluoride-PolyScreen, Amersham, GE). Luego se bloqueó con leche 5% en buffer fosfato salino (PBS) durante 1 hora y se realizó tres lavados por 5 minutos con PBS-Tween 0,1%(PBST). La incubación se realizó con la dilución correspondiente de anticuerpo primario en PBS con leche 5%, durante 1 hora a  $37^{\circ}C$ .

Proteína	Organismo	Marca	Dilución
Ciclooxigenasa-2	Policlonal, conejo	Abcam, Ab 52237	1:500
IgG de conejo- acoplado a HRP	Burro	Amersham, NA934V	1:2000

**Tabla 3.** Lista de anticuerpos utilizados en el Western Blot donde se indica la proteína, el organismo en el que se produjo, marca y la dilución utilizada.

Luego de tres lavados de 10 minutos con PBST, la membrana se incubó con una dilución del anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (HRP), por otra hora a 37°C.

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBST. El revelado se llevó a cabo con un Kit Kalium® y la exposición se realizó en Amersham Imager 600.

Los anticuerpos que se utilizaron se presentan en la **Tabla 3**.

## 7. Análisis de la viabilidad celular

La determinación de citotoxicidad de la droga Etoricoxib se realizó por medio del método de MTT, bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difeniltetrazolico. El cual consiste en la reducción de esta sal por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa generando un producto de color azul denominado Formazán. Una mayor reducción del MTT implica una mayor precipitación del producto en el citoplasma celular y determina una menor toxicidad de la droga.

Se cultivaron monocapas celulares de Huh-7 y A549 en microplacas de 96 pocillos. Al alcanzar la confluencia, se trató cada pocillo con diferentes diluciones seriadas al medio con la droga e incubó por 24 horas a 37°C. Luego se agregó 10 µl de MTT en cada pocillo por 1 o 2 horas hasta observar una capa de precipitado del producto. Posteriormente, se desecha el sobrenadante y el producto se solubiliza con 200 µl de etanol 96° hasta homogeneizar. Se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a 570 nm (longitud de onda de prueba) y a 630 nm (longitud de onda de referencia).

Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular de las muestras tratadas respecto a las de referencia (sin tratar). Y se obtuvo la concentración citotóxica 50 (CC50) como la concentración de compuesto en la cual se observa el 50% de células viables.

## 8. Inhibición del rendimiento viral

En microplacas de 24 cavidades se cultivaron células Huh-7 y A549. Una vez alcanzada la confluencia se descartó el sobrenadante y agregó un inóculo de 0,1 ml de JUNV a una MOI de 0,1. Luego se incubó durante 1 hora a 37°C y pasado ese tiempo de adsorción se

descartó el inoculo y se agregaron distintas diluciones de Etoricoxib en MEM 1,5% SFB. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, desde que se agregó la droga, se cosechó el sobrenadante y colocó en Eppendorfs para titular con el método de UFP (ver Materiales y métodos, sección 3). Se realizaron controles de células sin infectar y células infectadas sin droga. Cada una de las muestras se realizó por duplicado. A partir de este método se determinó la concentración efectiva 50 (CE50), como aquella concentración de droga en la que se reduce el rendimiento viral en un 50%.

## 9. Actividad virucida

En tubos eppendorfs se colocaron 200 µl de Etoricoxib 400 µM junto con 200 µl del stock viral, llevando a una concentración final de la droga de 200 µM y una dilución al medio del virus. Como control viral se realizó la misma dilución de 200 µl del stock junto con 200 µl de medio MEM 1.5%, en ausencia de la droga.

Luego se incubaron los eppendorfs por una hora a 37°C y pasado ese tiempo, se realizaron diluciones seriadas al décimo. Se infectaron con un inoculo de 0.1ml monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos, siguiendo el método de titulación de UFP (ver Materiales y métodos, sección 3). Posteriormente se determinó el título viral expresado en UFP por mililitro.

## 10. Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar (SD).

La significancia estadística se evaluó mediante ANOVA con comparación entre grupos mediante la prueba de Tukey con el software R Studio v 4.1.1, a menos que se indique lo contrario.

La CC50 y CE50 fueron calculadas a partir de curvas dosis-respuesta usando el software GraphPad Prism 8.3.0. El índice de selectividad (IS) se calculó como el cociente CC50/CE50.

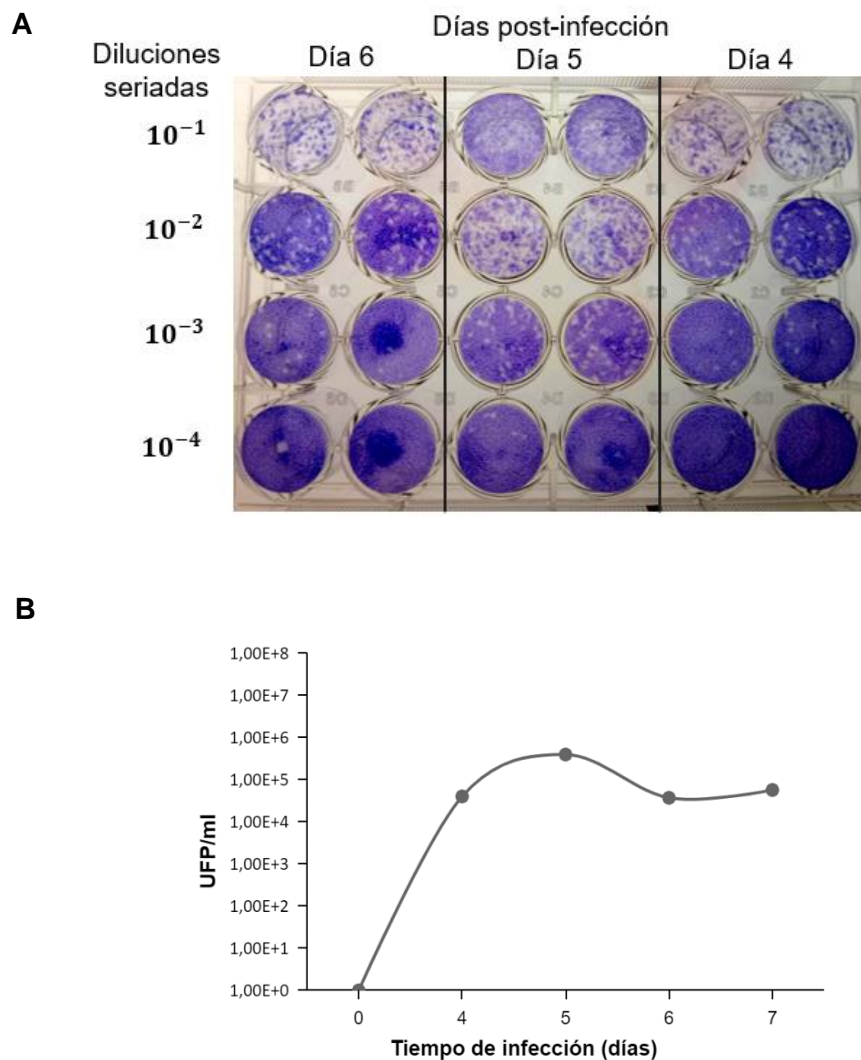
# Resultados

---



# 1. Producción del virus Junín

Se procedió a preparar un stock de trabajo en suficiente cantidad que permitiera realizar el conjunto de los ensayos planeados para este trabajo. Para ello se realizó una curva de crecimiento utilizando cultivos de células Vero, el sustrato más eficiente para la multiplicación de JUNV. Se infectó una monocapa con un inóculo conteniendo aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  UFP a una  $MOI=0,1$ . Se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la producción viral a distintos tiempos p.i. por medio del conteo de placas de lisis.



**Figura 10. Curva de crecimiento del virus Junín (JUNV).**

**A.** Imagen representativa de una placa multiwell en donde se realizó la titulación del Stock de la cepa IV4454 de JUNV. Luego de fijar los pocillos con formol, se reveló con Cristal violeta y calculó el título viral con el método UFP. Las columnas indican los días p.i. que se titularon y las filas las diluciones seriadas **B.** Producción viral en el sobrenadante de células Vero infectadas con JUNV. Se plaqueó y determinó UFP/ml en cada día señalado, de  $n = 2$  experimentos independientes.

En la **Figura 10A** se observa una fotografía correspondiente a esta titulación. El efecto citopático producido por el virus da como resultado, bajo un medio semisólido, placas de lisis definidas y enumerables. Según lo esperado el número de placas de lisis disminuye con las diluciones de cada una de las muestras o días cosechados. Se calculó el título para cada día p.i. en base a las diluciones en las cuales las placas fueron contables.

A continuación, se construyó la curva de crecimiento mostrada en la **Figura 10B**. Se puede observar que la producción viral alcanzó un máximo de  $5 \times 10^6$  UFP/ml al 5to día p.i. y según lo esperado, disminuye los días subsiguientes. De acuerdo a estos resultados se seleccionó el sobrenadante correspondiente al 5to día como stock viral para el desarrollo de la presente tesis.

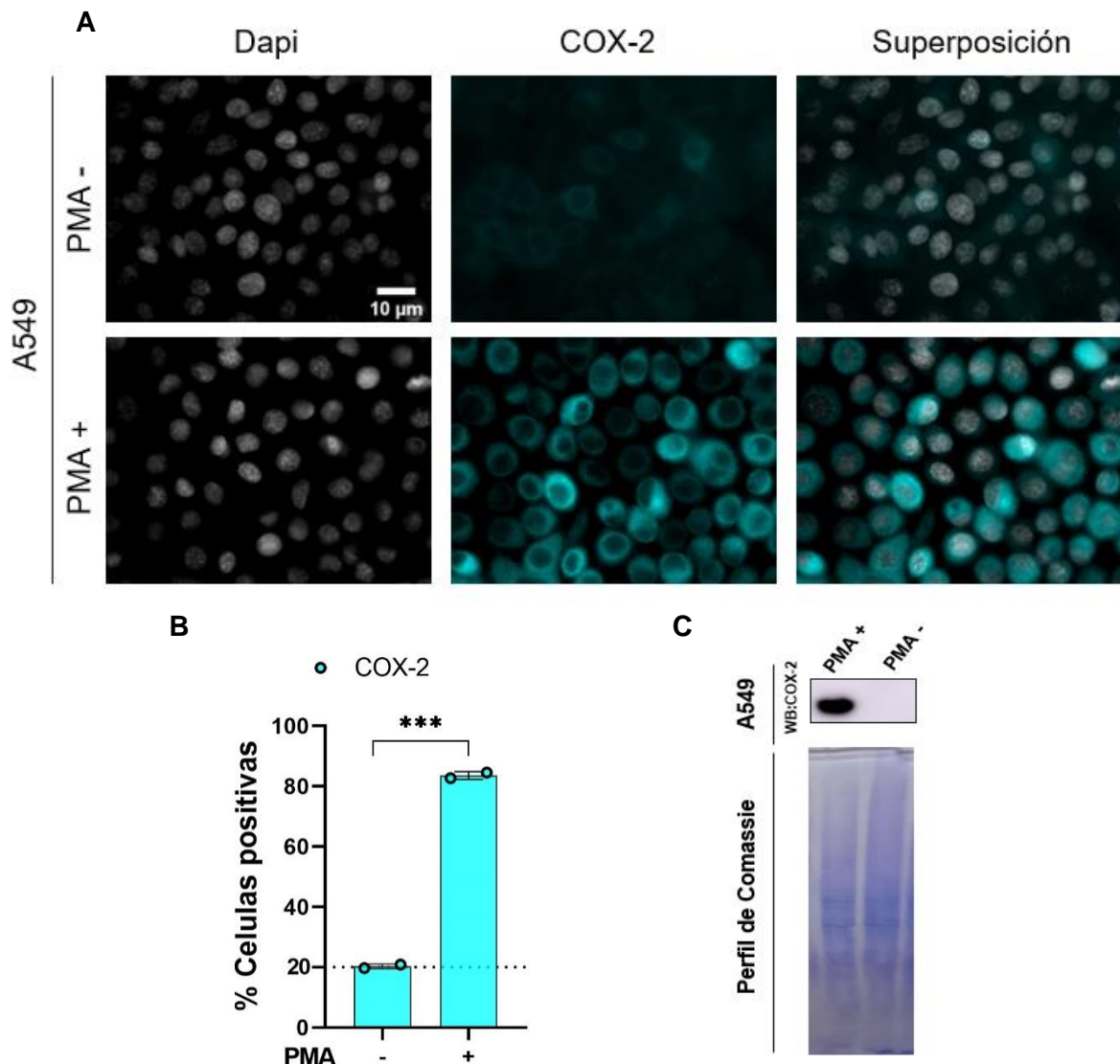
## 2. Expresión de COX-2 en cultivos A549

La línea celular humana A549 fue utilizada en este estudio por representar un tipo celular relevante en la infección con JUNV. Esta línea es ampliamente utilizada en los estudios relativos a infecciones virales y estimulación de factores celulares de la respuesta inmune innata (Peña Cárcamo et al., 2018; Valenzuela et al., 2021). Además, varios han reportado y descrito la expresión de COX-2 en esta línea frente a distintos estímulos. De acuerdo a datos hallados en bibliografía el tratamiento con PMA induce la expresión de la enzima en distintas líneas celulares incluyendo A549 (Kang et al., 2007; Luu et al., 2022; Patil et al., 2018).

Para comenzar el estudio se determinó la expresión de COX-2 en los cultivos A549 y frente al estímulo de PMA. Se trataron cultivos crecidos en monocapa con PMA  $0,1 \mu\text{M}$  por 4 horas. Luego de este tiempo se fijaron las células y se determinó la expresión de la proteína por inmunomarcación. En paralelo se crecieron cultivos sin estimular y fueron utilizados como control. En la **Figura 11A** se muestran microfotografías representativas del ensayo realizado. La primera columna muestra la detección de núcleos (DAPI) y en la segunda columna la marcación con el anticuerpo anti-COX-2 (canal cian). Se puede observar que en ausencia del tratamiento con PMA hay una expresión muy débil de la enzima. Cuando en estos cultivos se cuantificó el número de células positivas relativo a las células totales, se determinó un 20% de positividad. Consideramos así estos niveles de la proteína COX-2 como basales para el análisis de nuestros cultivos A549 sin infectar. Cuando se examinaron los cultivos estimulados con PMA se verificó la capacidad de este cultivo de inducir la expresión de COX-2 y se observó un aumento significativo en cantidad de células positivas

para la expresión de esta proteína. La cuantificación permitió determinar niveles de expresión mayor al 80% (**Figura 11B**).

Muestras similares estimuladas y sin estimular con PMA se procesaron para su análisis por la técnica de WB. Se sembraron ambas muestras en un gel de poliacrilamida, se realizó la corrida electroforética y posteriormente la transferencia de proteínas. Como se muestra en la **Figura 11C** cuando se reveló con anticuerpos específicos para la enzima, COX- 2 fue detectada solo en aquellos cultivos estimulados. En los cultivos controles no fue posible detectar la banda correspondiente.



**Figura 11. Expresión y cuantificación de COX-2 en células tratadas con PMA.**

**A.** Expresión de la proteína COX-2 revelado por IFI con anticuerpo anti-COX-2 policlonal de conejo (canal cian), marcación de los núcleos con Dapi y la superposición de los dos campos. Los cultivos celulares A549 se trataron con 0,1 $\mu$ M de PMA por 4 horas. **B.** Cuantificación del Porcentaje de células positivas para COX-2 en presencia (PMA+) y ausencia (PMA-) del tratamiento. Los resultados se indican como la media  $\pm$  DE y el análisis fue de al menos 7 campos para cada tratamiento, de n = 2 experimentos independientes. \*\*\* p < 0,0001. **C.** WB en presencia o ausencia de PMA, siendo n=1. También se observa el gel de corrida de la electroforesis teñido con azul de Comassie.

### 3. Estudio de la expresión de COX-2 durante la infección con JUNV

#### 3.1. Análisis de la expresión de COX-2 por RT- PCR

Una vez determinado que los cultivos celulares utilizados para este estudio eran capaces de expresar la enzima de nuestro interés, se procedió al estudio de cultivos infectados con JUNV. Para ello monocapas infectadas durante 24 h fueron procesadas para el análisis de mensajeros (ARNm) de COX-2. Se lisaron las células, se extrajo RNA total y se desarrolló una reacción de retrotranscripción de todas las muestras para la obtención de ADNc. Previo a la PCR se establecieron las condiciones óptimas (temperatura de *annealing*) para los *primers* adquiridos ya que los mismos no habían sido previamente utilizados en el laboratorio (ver materiales y métodos, sección 5).

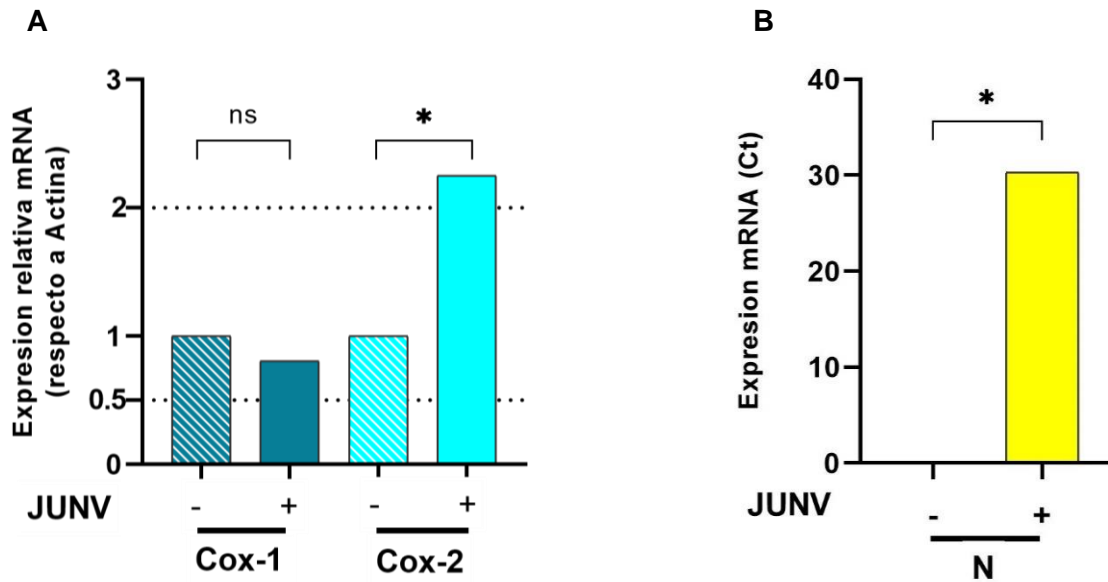
A partir del ADNc se amplificaron por PCR en tiempo real los genes de COX-1 y COX-2. Como gen normalizador se amplificó actina y para comprobar la infección de los cultivos se amplificó el gen viral NP. Cultivos sin infectar fueron utilizados como control.

Se realizó la RT-PCR como se indica en materiales y métodos (sección 5) y en base a los valores obtenidos, se normalizó la expresión relativa de los ARNm de interés respecto a actina. Luego se calculó la diferencia de expresión relativa de la condición control vs. la infectada (24 h p.i.), para cada uno de los ARNm.

Los valores relativos de expresión 0,5 y 2 se determinaron como valores de corte. Valores encima de 2 presentan un aumento significativo respecto al control y aquellos por debajo de 0,5 se inhiben respecto a los valores de control. Como se muestra en la **Figura 12A** la expresión relativa de COX-1 no varía en las células infectadas en relación a las no infectadas. Este resultado es esperable ya que, la isoforma 1 de la ciclooxigenasa se expresa de manera constitutiva y su expresión no es inducible.

Sin embargo, para el mensajero de COX-2 se observa un aumento relativo de expresión de 2,25 veces, a las 24 h p.i. respecto del control, lo que indica que su expresión frente a la infección viral aumenta.

Con las mismas muestras se realizó la amplificación del gen viral N en ambas condiciones, y como confirmación de la infección exitosa de estos cultivos al tiempo analizado. En el gráfico de la **Figura 12B** se observa que en el control sin infectar no se amplifica el ARN viral (N). En los cultivos infectados por otro lado, los valores de Ct obtenidos son los esperados para las 24 p.i.



**Figura 12. Expresión de ARNm, COX-2 y COX-1 en A549 a 24h p.i.**

Se infectaron células A549 con JUNV a una MOI de 0,1 UFP/célula. A las 24h p.i. se levantaron con Trizol, extrajo el ARN y sintetizó ADNc, para luego realizar RT-PCR. **A.** Expresión relativa de mensajero (respecto a Actina) para COX-1 y COX-2 en células A549 24 h p.i. Con el signo positivo (+) se muestran las células infectadas y con signo negativo (-) células sin infectar utilizadas como control. Los resultados de la figura 3A se obtuvieron a partir del Método delta deltaCt ( $\Delta\Delta Ct$ ), en donde se normalizo la Ct de cada muestra con el control de actina y se obtuvo la delta Ct de los cultivos infectados y no infectados. A posteriori se normalizo la delta Ct de los cultivos infectados respecto a los no infectados obteniéndose así la  $\Delta\Delta Ct$ . Para calcular la variación relativa se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . **B.** Expresión de ARN viral en cultivos infectados y su control sin infectar, se grafican los valores de Ct, n=1. Los asteriscos indican diferencias significativas y **ns** no significativo.

### 3.2. Análisis de la expresión de COX-2 por inmunomarcación

A continuación, se analizó la expresión de la proteína COX-2 en los cultivos infectados con JUNV. Teniendo en cuenta que su mensajero está significativamente inducido a las 24 h p.i. se quiso evaluar esta vez otros tiempos de infección. Se infectaron los cultivos crecidos sobre vidrios con JUNV (MOI= 0,1) y se fijaron a 5, 24, 48 y 54 h p.i. Para cada tiempo de infección se fijaron respectivos controles sin infectar.

Se realizó una inmunomarcación con anticuerpos específicos para revelar la enzima COX-2, como en la **Figura 11**. En simultáneo y para la identificación de las células infectadas se utilizaron anticuerpos anti-NP. Todos los núcleos celulares se marcaron con la sonda DAPI. Se utilizó para proteínas virales el anticuerpo secundario IgG de ratón- Alexa 568. Por otra parte, para COX-2 se utilizó el anticuerpo secundario IgG de conejo- Alexa 488.

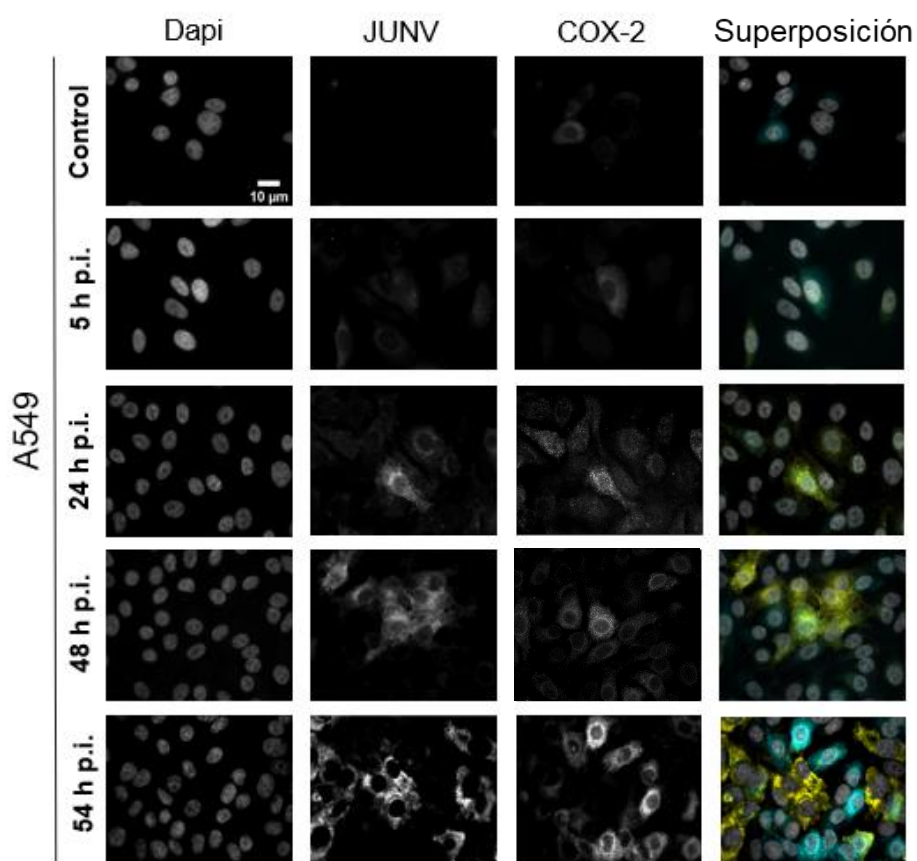
Las muestras se observaron por microscopía de fluorescencia y se documentó tomando imágenes de campos al azar. En la **Figura 13** se muestran microfotografías representativas de estas inmunofluorescencias. La primera columna muestra los núcleos marcados con DAPI y la segunda columna la marcación de las células infectadas o JUNV (+). Le sigue la

marcación con COX-2 y en la última columna la superposición de imágenes. En esta última, se marcó la proteína viral en amarillo y COX-2 en cian.

La primera fila de la figura corresponde a las monocapas celulares sin infectar o controles.

En estas muestras no se observa, según lo esperado, marcación de antígeno viral JUNV. Asimismo, en estas monocapas hay algunas células positivas para COX-2, como expresión basal y tal como se determinó en la **Figura 11**.

Las siguientes filas de microfotografías muestran los distintos tiempos p.i. en las monocapas infectadas. Se puede observar un aumento progresivo en el número de células infectadas (columna JUNV) así como en la expresión de COX-2.



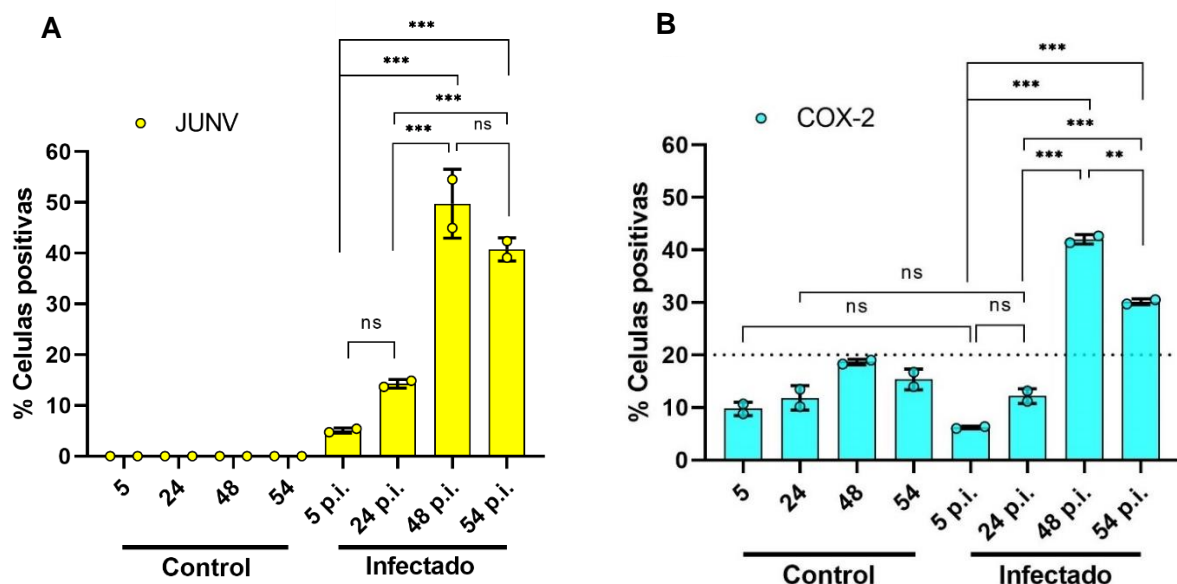
**Figura 13. Expresión de COX-2 en cultivos infectados a diferentes tiempos p.i.**

Los cultivos se fijaron y co-marcaron por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-COX-2 policlonal de conejo (canal cian) y anti-N monoclonal de ratón (canal amarillo) a 5, 24, 48, 54 horas p.i.

Magnificación 60x.

Se observa la co-positividad, en algunos casos, de células COX-2 (+) que son también JUNV (+) a las 24 y 48 h p.i. Por otro lado, a las 54 h p.i. además de un aumento en el porcentaje de células positivas para la expresión de COX-2, se observa un patrón de exclusión. Es decir, las células COX-2 (+) son negativas para el antígeno viral o JUNV (-).

En base a los ensayos de fluorescencia y la documentación fotográfica correspondiente, en la **Figura 14A** se muestra la cuantificación de células infectadas (JUNV: barras amarillas) y en **14B** el número de células expresando COX-2 (barras celestes). La cuantificación de células positivas se realizó para ambos casos en los cultivos infectados y cultivos sin infectar; y a cada uno de los tiempos a los cuales se fijaron las monocapas infectadas. Según se ve en la figura se expresa la cuantificación como % de positividad relativizándolo a la cantidad de núcleos (células totales) en cada campo y se calculó el porcentaje a distintos tiempos p.i.



**Figura 14. Porcentaje de células positivas para la expresión de COX-2 y proteínas virales (JUNV) a diferentes tiempos p.i. en cultivos celulares.**

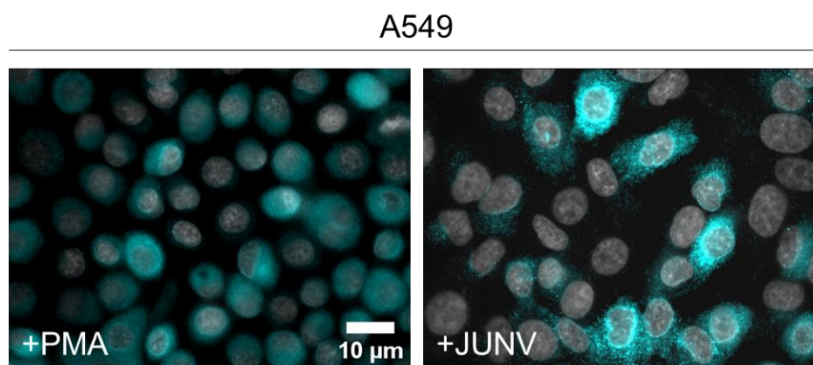
Células A549 infectadas (+) con JUNV (MOI=0,1) a 5, 24, 48 y 54 horas p.i., con sus respectivos controles (-). Se contaron al menos 4 campos para cada tratamiento de 2 experimentos independientes y se promediaron respecto al número total de núcleos en cada campo. **A.** Porcentaje de células positivas para JUNV. **B.** Porcentaje de células positivas para COX-2. Los resultados se obtuvieron a partir de la implementación de un modelo lineal general con un diseño de bloques al azar. Los valores se reportan como la media  $\pm$  SD de  $n = 2$  experimentos independientes y los asteriscos indican diferencias significativas (\*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; ns = no significativo).

La cuantificación en la **Figura 14A** muestra el porcentaje de células infectadas, mientras que en los controles es cero. En los cultivos infectados el porcentaje de células expresando antígeno viral, en cambio, incrementa con el tiempo de infección y alcanzando valores del 40-50% a partir de las 48 h p.i. La estadística señaló que el % de células infectadas no varía significativamente entre 5 y 24 h p.i. sin embargo sí lo hace en el resto de los tiempos analizados. En el gráfico correspondiente a COX-2 (**Figura 14B**) se ve que en células control (sin infectar) hay expresión de COX-2 a todos los tiempos analizados y los valores se



encuentran siempre en torno del 20%. En concordancia con lo determinado en la **Figura 11** estos valores fueron considerados basales y se señala ese umbral con línea punteada. En los cultivos infectados a las 5 horas p.i. el número de células expresando COX-2 corresponde con valores similares a los anteriormente denominados basales. En cambio, a partir de las 48 h p.i. el número de células COX-2 (+) en los cultivos infectados se incrementa superando el 20%. Cuando se realizó la estadística sobre los datos de COX-2 se determinó que los controles (sin infectar) difieren significativamente de los cultivos infectados (\*\* $p < 0.001$ ), excepto a las 5 y 24 h p.i. que no muestran diferencias significativas (ns). A partir de las 48 h p.i. aumenta la expresión de COX-2 respecto al control en los cultivos infectados, alcanzando un máximo del 40% de positividad. Por otra parte, se hizo la comparación entre horas p.i. Se observó que las 5 h y 24 h p.i. difieren significativamente de 48 h y 54 h p.i. (\*\* $p < 0.001$ ). Entre 48 y 54 h p.i. el número de células COX-2 (+) comienza a disminuir siendo estas diferencias significativas (\*\* $p < 0.01$ ).

Adicionalmente a las cuantificaciones realizadas se pudo observar que el patrón de expresión de COX-2 en los cultivos infectados difiere del observado con la estimulación de PMA. En La **Figura 15** se muestra un comparativo de imágenes en aumentos equivalentes. Al estimular COX-2 con PMA se evidencia un patrón difuso citoplasmático (panel izquierdo), mientras que, en cultivos infectados el patrón de expresión de la enzima fue principalmente puntilloso, de localización citoplasmática y perinuclear (panel derecho). Esto indica que la expresión de la enzima difiere según el tipo de estímulo que recibe y que frente a la infección con JUNV podría tener una localización específica y más restringida espacialmente.



**Figura 15. Expresión de COX-2 en cultivos tratados con PMA y cultivos infectados con JUNV.**

Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de A549 tratados con PMA (PMA+) sin infectar (izquierda). Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de A549 infectados con JUNV (JUNV+) en ausencia de tratamiento y a las 54 horas p.i. (derecha)



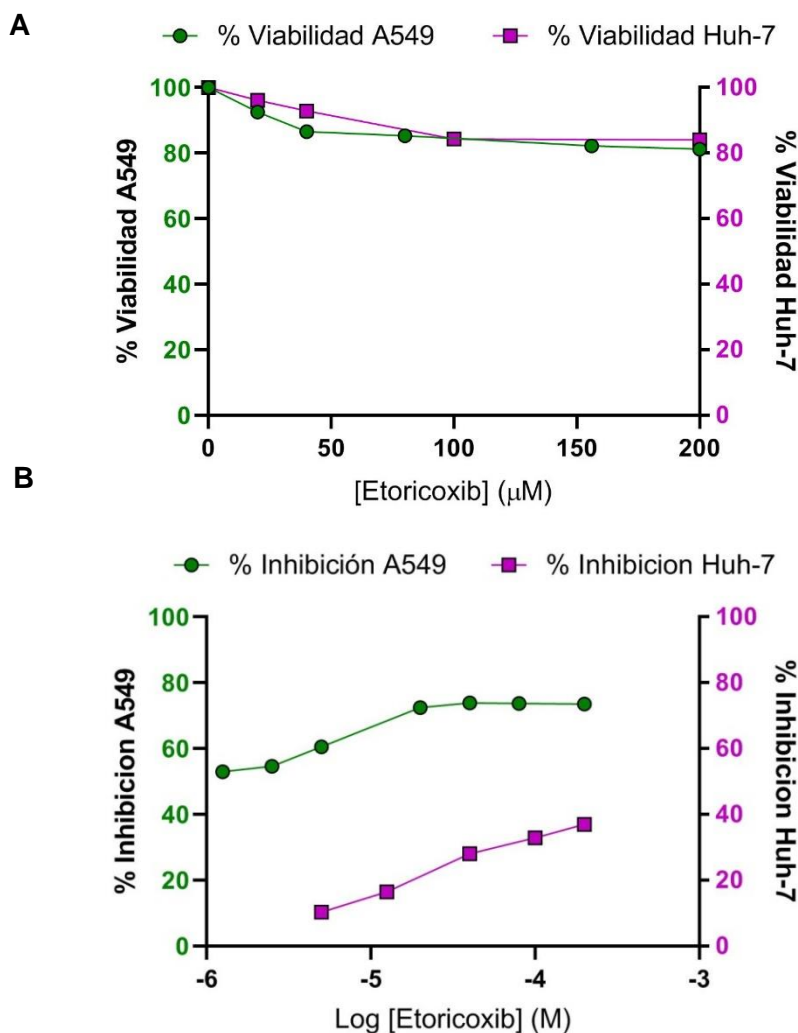
### 3.3. Inhibición de la actividad enzimática de COX-2 en cultivos infectados

En base a los resultados que mostraron la expresión de COX-2 durante la infección con JUNV se quiso determinar la posible función de COX-2 en los cultivos infectados.

Para ello, se utilizó un inhibidor selectivo de la actividad enzimática de COX-2, Etoricoxib. Para este ensayo adicionalmente y con fines comparativos, se utilizó la línea celular humana Huh-7. Inicialmente se expusieron los cultivos a un rango de concentraciones de 0 a 200  $\mu\text{M}$  y por 24 h, teniendo en cuenta datos de bibliografía para ETO y de otros inhibidores de la misma familia (Esser et al., 2005; Ramer et al., 2013; Riendeau et al., 2001). Se determinó el porcentaje de viabilidad celular (A549 o Huh-7) por medio del método MTT. Se midió la absorbancia y se calcularon los porcentajes de viabilidad en cada concentración relativizando con el control y tomando a este como el 100%. En la **Figura 16A** se observa que la viabilidad del cultivo de A549 (curva verde) en concentraciones de 20 a 200  $\mu\text{M}$  de la droga se mantuvo siempre por encima del 80%. Los cultivos Huh-7 (curva violeta) mostraron valores de viabilidad similares a los cultivos A549. En ambos casos la CC50 no fue alcanzada, determinando que su valor fue mayor a 200  $\mu\text{M}$ .

De forma similar y con las mismas concentraciones de inhibidor se determinó el efecto sobre la multiplicación de JUNV. Se infectaron tanto células A549 como Huh-7 y luego de retirar el inóculo se trató con el inhibidor durante 24 h p.i. Se cosecharon los sobrenadantes y determinaron los títulos virales por el método de UFP. En la **Figura 16B** se grafican las curvas dosis-respuesta de ETO. Se muestran los porcentajes de inhibición de la multiplicación viral relativizando al cultivo infectado en ausencia de inhibidor como 0% de inhibición. Se observa para los cultivos A549 la curva de inhibición viral en el rango de 1.25 a 200  $\mu\text{M}$ . Se puede observar una reducción pronunciada de la producción viral en el rango de 0 a 20  $\mu\text{M}$  y alcanzando un máximo de inhibición del 70%. La CE50 resultó menor a 1.25  $\mu\text{M}$  y la CC50 es mayor a 200  $\mu\text{M}$ . El índice de selectividad (IS) se estimó mayor a 160.

Para el caso de los cultivos Huh-7 se muestra una curva de inhibición entre 5 a 200  $\mu\text{M}$ . La inhibición no resultó ser tan pronunciada alcanzando además valores de inhibición máximos del 37%. Por lo tanto, para esta línea celular la CE50 es mayor a 200  $\mu\text{M}$ , su CC50 es mayor a 200  $\mu\text{M}$  y su IS mayor a 1.

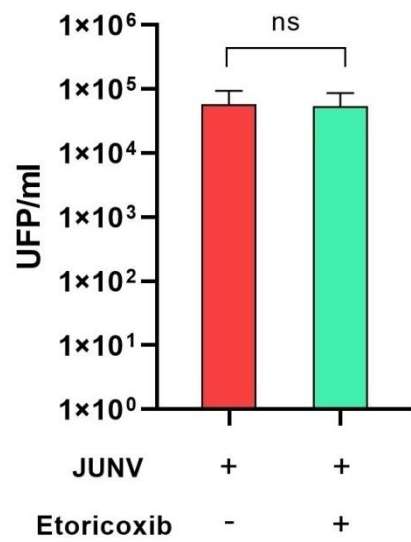


**Figura 16. Análisis de citotoxicidad y de inhibición con Etoricoxib a diferentes concentraciones.**

**A.** Porcentaje de viabilidad para diferentes concentraciones de ETO (hasta 200μM) para células A549 (●) y Huh-7 (■) sin infectar y tratadas por 24 horas, n=1. **B.** Porcentaje de inhibición de la multiplicación viral para diferentes concentraciones de la droga ETO (hasta 200μM) para células A549 (●) y Huh-7 (■) infectadas y tratadas por 24 horas, de n = 1 experimentos independientes.

### 3.4. Actividad virucida de Etoricoxib

Durante la búsqueda bibliográfica sobre ETO y su efecto sobre distintos modelos virales no se encontraron datos sobre una posible actividad virucida. Sin embargo, en ninguno de los artículos consultados se ensayó esta actividad por lo se decidió realizarlo en nuestro sistema. Se utilizó la máxima la concentración de etoricoxib ensayada en la **Figura 16** y se permitió el contacto de la misma con un inoculo viral de  $2 \times 10^5$  UFP/ml. Luego de 1 h a 37°C se procedió a titular la infectividad del inóculo tratado por el método de UFP. Como control se incubó un inóculo sin droga en las mismas condiciones. Como se observa en la **Figura 17** el inhibidor ETO no tuvo ningún efecto deletéreo sobre las partículas virales conservando la infectividad en valores comparables con el inóculo control.



**Figura 8. Actividad virucida de Etoricoxib.**

Células Vero infectadas con JUNV (MOI: 0,1) en presencia o ausencia de Etoricoxib. Se incubó la suspensión de JUNV junto con Etoricoxib por una hora a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas, tituló luego por el método de UFP y determinó UFP/ml. Como control viral se incubó el virus en ausencia de la droga. Los datos representan la media  $\pm$  DE de n = 2 experimentos independientes, realizados por duplicado. El análisis estadístico es ANOVA de un factor con el método de comparación a posteriori Tukey. P valor: 0.9204, se considera significativo p valor < 0.05. ns: no significativo.

# Discusión y conclusiones

---

Los virus son parásitos intracelulares obligados cuyo ciclo de multiplicación se desarrolla en gran medida gracias al aporte de factores celulares, considerados por ello pro-virales. Por otro lado, las células infectadas son capaces de censar el ingreso de patógenos y expresar, en consecuencia, factores específicos. Estos factores formarán parte de una respuesta antiviral con el objetivo de entorpecer la multiplicación o, en el mejor de los casos, eliminar el microorganismo invasor.

Conocer el perfil detallado de factores celulares activos durante la replicación de un virus determinado permite no solo comprender con mayor profundidad la biología del sistema parásito-hospedador; sino que además permite un mejor análisis de nuevos blancos antivirales y posibles estrategias de intervención frente a las infecciones virales.

Dentro del objetivo general de comprender estos fenómenos de fisiología celular condicionada por la infección con JUNV y la dinámica estímulo-respuesta durante las distintas etapas del ciclo de multiplicación en células humanas; se quiso abordar el estudio de una enzima relevante dentro de la respuesta innata y pro-inflamatoria. Las COXs son enzimas muy estudiadas en el contexto inflamatorio y condiciones tumorigénicas. En los últimos años, además, se ha acumulado evidencia de su rol durante distintas infecciones virales. Por ejemplo, virus como dengue inducen la expresión de COX-2 por activación de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y MAP quinasas. Esto da como resultado un aumento en la síntesis proteica de COX-2 y de su producto PGE<sub>2</sub>, que lleva a una mayor actividad de la polimerasa viral. Por lo tanto, la síntesis de la proteína COX-2 tiene un rol pro-viral durante el ciclo de multiplicación (Lin et al., 2017).

En este trabajo se abordó el estudio de la expresión de COX-2 durante la infección de células humanas A549, con JUNV. Esta línea celular de origen tumorigénico ha sido utilizada como modelo de estudio tanto en cáncer como en otras infecciones virales (Liou et al., 2008; Dudek et al., 2016; Meng et al., 2012; Chen et al., 2021). Al analizar esta enzima en el contexto de la infección con JUNV, además, se tuvo en cuenta la gran cantidad de estudios farmacológicos disponibles sobre inhibidores de esta enzima y sus usos actuales como drogas antiinflamatorias no esteroideas. De esta forma, en el caso de determinar un rol importante de COX-2 en nuestro modelo de estudio, la reutilización o reposicionamiento de drogas ya existentes en el mercado representaría un aspecto interesante y una proyección posible para el estudio iniciado.

Como primer paso se establecieron los niveles de expresión de COX-2 en nuestra línea celular y la capacidad de modularlos con un inductor conocido: PMA. Se analizaron, entonces, los cultivos celulares por la técnica de inmunofluorescencia, cuantificando las células positivas para COX-2 respecto de las totales (**Figura 11**). Como resultado se encontró que en estos cultivos A549 existe una expresión discreta de COX-2, observando

algunas células positivas con niveles bajos de intensidad. Estos datos no sorprendieron y resultan esperables teniendo en cuenta la naturaleza tumorigénica de la línea. El porcentaje de células COX-2 (+) fue del 20% aproximadamente. Cuando se desafió el cultivo con PMA se evidenció una respuesta muy eficaz en la estimulación de COX-2. Esta vez las células presentaban una incrementada fluorescencia con niveles de expresión del 80% del total de células analizadas. Cuando se procesaron cultivos para su análisis por la técnica de WB se observó la presencia de COX-2 en las muestras estimuladas con PMA, sin embargo, no fue posible observar una banda en los cultivos sin estimular. Si bien se intentó esto en dos oportunidades, el resultado fue siempre negativo. La ausencia de banda podría explicarse por el bajo contenido de COX-2 en las células sin estimular (20%), aunque para afirmar esto sería necesario probar otras condiciones para el revelado del WB. Al cabo de estos experimentos se pudieron establecer las características intrínsecas de nuestro cultivo, previo al análisis de cultivos infectados. Asimismo se determinó que en las condiciones utilizadas el ensayo de inmunofluorescencia resultó más sensible que el de WB

A continuación, y como primer ensayo sobre los cultivos infectados, se determinaron los niveles de ARNm de COX-2 a las 24 h p.i. Como controles se utilizaron cultivos sin infectar procesados simultáneamente con los infectados. Se cuantificó además el ARNm de COX-1 como enzima celular de expresión constitutiva. Se observó que efectivamente COX-1 presenta niveles de expresión similares al comparar los cultivos infectados con los no infectados. Al analizar la abundancia relativa de COX-2 se encontró que a las 24 h p.i. su mensajero incrementó en 2.25 veces, en comparación con los cultivos controles sin infectar (**Figura 12**).

Si bien los valores de ARNm se elevan al infectar los cultivos A549 con JUNV, se quiso determinar si ese aumento correlacionaba con un aumento a nivel proteico de COX-2. Varios estudios demostraron que esta correlación no se cumple, es decir, se observa mayor incremento en los niveles del mensajero que en la proteína. Por ejemplo, en cánceres de colon y en líneas celulares de cáncer de colon el ARNm de COX-2 se expresa en niveles altos, mientras que, los niveles de la proteína son menores (Hsi et al., 2000; Shao et al., 2000). Además, se ha descrito que COX-2 puede ser regulada mediante la vida media de su mensajero. La regulación ocurre principalmente en las regiones 3'-UTR del mensajero que contiene secuencias ARES, afectan la estabilidad del mismo (elementos regulatorios), regulando los eventos post-transcripcionales y la eficiencia de la traducción (Cok y Morrison, 2001).

Según un trabajo de Mukhopadhyay et al. (2003) existen proteínas que reconocen el ARNm de COX-2, se asocian a éste y lo estabilizan inhibiendo, sin embargo, su traducción. Esta

disminución en la expresión proteica y, a su vez, en PGE2 depende del tipo de estímulo que se induce sobre las líneas celulares, como por ejemplo radiación.

Para establecer entonces los niveles de la enzima COX-2 presentes en las células infectadas con JUNV, se recurrió a la marcación con anticuerpos específicos. Se realizó recuento de células positivas fluorescentes ya que esta técnica, como se mencionó, demostró ser la más sensible y reproducible. Se hizo un análisis a lo largo del tiempo en cultivos infectados con JUNV y se determinó que el número de células estimuladas para la producción de COX-2 aumenta con el tiempo de infección alcanzando valores del 40% a las 48 h p.i.. Los niveles de COX-2 en las células sin infectar se mantuvieron constantes a lo largo de los distintos tiempos ensayados y siempre alrededor del 20%, tal como se había determinado al inicio del estudio. Los valores de COX-2 a las 5 y 24 h p.i son comparables a los controles, sin embargo, a las 48 h p.i. estos valores aumentan y alcanzan un máximo. Como conclusión entonces encontramos que en las células infectadas con JUNV existe un aumento de niveles de transcripción como de traducción del gen PTGS-2.

Varios estudios realizados en otros modelos virales muestran que la expresión de COX-2 aumenta. Por ejemplo para Hepatitis B, se observó un aumento en células HepG2 con la técnica de WB a las 24 y 48 h p.i. (Yue et al., 2011). Esto también se observó para Hepatitis C con la misma técnica, pero en células Huh-7.5.1.(Lu et al., 2015). Además de la expresión proteica, los autores corroboraron un aumento en el mensajero, utilizando la técnica de Northern blot. Yan y col. (2006) han descrito que el aumento de COX-2 en cultivos infectados con SARS-CoV-1 se debe a que la nucleoproteína de este virus se une a su promotor y regula su expresión.

Otro estudio realizado en fibroblastos primarios de prepucio humano e infectado con HCMV, mostró un aumento de COX-2. La expresión se analizó a diferentes tiempos p.i. abarcando desde 8 hasta 48h p.i. (Zhu et al., 2002). Más recientemente se describió un aumento de COX-2 por PCR en tiempo real y a las 24 h p.i.; en células humanas de epitelio bronquial e infectadas con Parainfluenza (Lewandowska-Polak et al., 2019). Para SARS-CoV-2 se observó un aumento en ARNm de COX-2 en células Calu-3 y A549 a los 2 días p.i. por medio de técnicas de ARN-seq y PCR cuantitativa (Chen et al., 2021).

Es importante señalar que, en general, los trabajos analizan la expresión de COX-2 por RT-PCR o por WB. Pocos trabajos han descrito la expresión de esta enzima por microscopía por lo que resultó difícil comparar nuestros resultados con la bibliografía. En este sentido, una observación que se realizó sobre las imágenes de las inmunomarcaciones permitió determinar que el patrón de fluorescencia de las células inducidas por PMA es distinto del patrón inducido en las células infectadas (**Figura 15**). En las células inducidas por PMA el patrón se presenta de manera difusa en todo el cuerpo celular, a excepción del núcleo. En

aquellas células infectadas con JUNV el patrón de distribución de COX-2 es más discreto con estructuras puntiformes más o menos grandes e intensas, siguiendo una distribución sugerente de retículo. En el presente trabajo, no hemos determinado fehacientemente el compartimento celular en el que se localiza COX-2 durante la infección con JUNV. Este es un aspecto que merece abordarse en el futuro, sin embargo, podemos sugerir que su localización es perinuclear y en RE.

Teniendo en cuenta que las vías de estimulación de COX-2 son complejas e involucran una cantidad de factores diferentes, los cuales se desconoce si están involucrados total o parcialmente durante el estímulo por JUNV, la observación de la **Figura 15** no sorprende. Sin embargo, sugiere que la vía de inducción involucrada durante la infección determina una localización sub-celular diferente a la observada en presencia del inductor PMA. Queda por establecer que vías y que sitios celulares son relevantes durante la expresión de COX-2 en células infectadas con JUNV. Esta información además podría ayudar a esclarecer la función de COX-2 durante el ciclo de multiplicación viral.

Luego de determinar que JUNV era capaz de estimular la expresión de COX-2 se abordó el estudio de la funcionalidad que podría tener este incremento. Se recurrió, entonces, a la estrategia de inhibir COX-2 mediante la intervención farmacológica para determinar la importancia de la actividad de esta enzima durante el ciclo de replicación de JUNV. Se utilizó etoricoxib una droga ampliamente descrita por su actividad específica anti-COX-2. Cuando se trataron células infectadas durante 24 h con distintas concentraciones de la droga se observó que la producción viral en el sobrenadante disminuye de forma dependiente de la dosis, y cuando los niveles de toxicidad están por debajo del 20% (**Figura 16**). De esta forma se evidenció que la actividad de COX-2 es necesaria para un normal desarrollo de ciclo de multiplicación viral. Aunque no se determinó el mecanismo subyacente, se le podría atribuir una función pro-viral.

Recientemente se encontró que drogas AINE como el naproxeno son capaces de unirse al dominio N-terminal de la nucleoproteína de SARS-CoV-2 y limitar su unión a los RNA virales (Terrier et al., 2021). La actividad antiviral del naproxeno y sus derivados fue demostrada en cultivos celulares tanto para SARS-CoV-2 como para Influenza A (Lejal et al., 2013). Además, Terrier et al., (2021) encontraron que celecoxib, otro inhibidor específico de COX-2, favorece la dimerización de la nucleoproteína de SARS-COV-2 y por consiguiente estabiliza su conformación biológica. Al tratar cultivos infectados con esta droga, a bajas concentraciones, observaron una actividad pro-viral. Estos trabajos ponen de manifiesto la importancia de caracterizar los mecanismos de acción antivirales de drogas conocidas. En este caso el aumento de la replicación viral en presencia de un inhibidor de COX-2 no



estaría solo relacionado al detrimento de la funcionalidad de COX-2 durante el ciclo de multiplicación, sino a un blanco directo viral, previamente no considerado.

Los experimentos desarrollados durante esta tesis con el inhibidor de COX-2, ETO, mostraron una disminución en la producción de partículas infecciosas de JUNV. Si bien esto sugeriría que la función enzimática de COX-2 es necesaria para el normal desarrollo del ciclo de replicación, y en vista de los resultados citados, no podemos descartar algún posible blanco viral. Si podemos descartar que esta droga no afecta la estructura del virión, por lo que no presenta actividad virucida.

# Bibliografía

---

- Afroz, S., Battu, S., Giddaluru, J., & Khan, N. (2020). Dengue Virus Induced COX-2 Signaling Is Regulated Through Nutrient Sensor GCN2. *Frontiers in Immunology*, 11, 1831. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01831>
- Baghaki, S., Yalcin, C. E., Baghaki, H. S., Aydin, S. Y., Daghan, B., & Yavuz, E. (2020). COX2 inhibition in the treatment of COVID-19: Review of literature to propose repositioning of celecoxib for randomized controlled studies. *International Journal of Infectious Diseases*, 101, 29-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1466>
- Burri, D. J., Palma, J. R., Kunz, S., & Pasquato, A. (2012). Envelope Glycoprotein of Arenaviruses. *Viruses*, 4(10), 2162-2181. <https://doi.org/10.3390/v4102162>
- Carrossini, N., Meireles Da Costa, N., Andrade-Barreto, E., Sousa, V. P. L., Nicolau-Neto, P., Souza-Santos, P. T., Mansur, G. R., Wernersbach, L., Bozza, P. T., Viola, J. P. B., & Ribeiro Pinto, L. F. (2021). Lipid droplet biogenesis and COX-2 pathway activation are triggered by Barrett's esophagus and adenocarcinoma, but not esophageal squamous cell carcinoma risk factors. *Scientific Reports*, 11(1), 981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80035-4>
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926-13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>
- Charrel, R. N., & de Lamballerie, X. (2010). Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.027>
- Chen, J. S., Alfajaro, M. M., Wei, J., Chow, R. D., Filler, R. B., Eisenbarth, S. C., & Wilen, C. B. (2021). *Cyclooxygenase-2 is induced by SARS-CoV-2 infection but does not affect viral entry or replication* [Preprint]. Microbiology. <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.312769>

- Chen, W.-C., Tseng, C.-K., Chen, Y.-H., Lin, C.-K., Hsu, S., Wang, S.-N., & Lee, J.-C. (2015). HCV NS5A Up-Regulates COX-2 Expression via IL-8-Mediated Activation of the ERK/JNK MAPK Pathway. *PLOS ONE*, *10*(7), e0133264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133264>
- Cok, S. J., & Morrison, A. R. (2001). The 3'-Untranslated Region of Murine Cyclooxygenase-2 Contains Multiple Regulatory Elements That Alter Message Stability and Translational Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 23179-23185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008461200>
- Contigiani, MS. (1977). Virulence differentiation of Junín virus strains by biological markers in mice and guinea pigs. *Medicina (B Aires)*, *37*(3), 244-251.
- Cordo, S. M., Valko, A., Martinez, G. M., & Candurra, N. A. (2013). Membrane localization of Junín virus glycoproteins requires cholesterol and cholesterol rich membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *430*(3), 912-917. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.053>
- de Bruin, N., Schneider, A.-K., Reus, P., Talmon, S., Ciesek, S., Bojkova, D., Cinatl, J., Lodhi, I., Charlesworth, B., Sinclair, S., Pennick, G., Laughey, W. F., Gribbon, P., Kannt, A., & Schiffmann, S. (2022). Ibuprofen, Flurbiprofen, Etoricoxib or Paracetamol Do Not Influence ACE2 Expression and Activity In Vitro or in Mice and Do Not Exacerbate In-Vitro SARS-CoV-2 Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1049. <https://doi.org/10.3390/ijms23031049>
- Djavani, M. M., Crasta, O. R., Zapata, J. C., Fei, Z., Folkerts, O., Sobral, B., Swindells, M., Bryant, J., Davis, H., Pauza, C. D., Lukashevich, I. S., Hammamieh, R., Jett, M., & Salvato, M. S. (2007). Early Blood Profiles of Virus Infection in a Monkey Model for Lassa Fever. *Journal of Virology*, *81*(15), 7960-7973. <https://doi.org/10.1128/JVI.00536-07>
- Djavani, M., Rodas, J., Lukashevich, I. S., Horejsh, D., Pandolfi, P. P., Borden, K. L. B., & Salvato, M. S. (2001). Role of the Promyelocytic Leukemia Protein PML in the

- Interferon Sensitivity of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of Virology*, 75(13), 6204-6208. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6204-6208.2001>
- Dudek, S. E., Nitzsche, K., Ludwig, S., & Ehrhardt, C. (2016). Influenza A viruses suppress cyclooxygenase-2 expression by affecting its mRNA stability. *Scientific Reports*, 6(1), 27275. <https://doi.org/10.1038/srep27275>
- Eligini, S., Colli, S., Habib, A., Aldini, G., Altomare, A., & Banfi, C. (2021). Cyclooxygenase-2 Glycosylation Is Affected by Peroxynitrite in Endothelial Cells: Impact on Enzyme Activity and Degradation. *Antioxidants*, 10(3), 496. <https://doi.org/10.3390/antiox10030496>
- El-Malah, A. A., Gineinah, M. M., Deb, P. K., Khayyat, A. N., Bansal, M., Venugopala, K. N., & Aljahdali, A. S. (2022). Selective COX-2 Inhibitors: Road from Success to Controversy and the Quest for Repurposing. *Pharmaceuticals*, 15(7), 827. <https://doi.org/10.3390/ph15070827>
- El-Miligy, M. M. M., Al-Kubeisi, A. K., Bekhit, M. G., El-Zemity, S. R., Nassra, R. A., & Hazzaa, A. A. (2023). Towards safer anti-inflammatory therapy: Synthesis of new thymol–pyrazole hybrids as dual COX-2/5-LOX inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 294-308. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2147164>
- Esser, R., Berry, C., Du, Z., Dawson, J., Fox, A., Fujimoto, R. A., Haston, W., Kimble, E. F., Koehler, J., Peppard, J., Quadros, E., Quintavalla, J., Toscano, K., Urban, L., Van Duzer, J., Zhang, X., Zhou, S., & Marshall, P. J. (2005). Preclinical pharmacology of lumiracoxib: A novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2: Preclinical pharmacology of lumiracoxib. *British Journal of Pharmacology*, 144(4), 538-550. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706078>
- Gallo, G. L., López, N., & Loureiro, M. E. (2022). The Virus–Host Interplay in Junín Mammarenavirus Infection. *Viruses*, 14(6), 1134. <https://doi.org/10.3390/v14061134>

- Gandhi, J., Khera, L., Gaur, N., Paul, C., & Kaul, R. (2017). Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00538>
- Gaudin, R., & Barteneva, N. S. (2015). Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. *Nature Communications*, 6(1), 6022. <https://doi.org/10.1038/ncomms7022>
- Gebhardt, B. M., Varnell, E. D., & Kaufman, H. E. (2005). Inhibition of Cyclooxygenase 2 Synthesis Suppresses *Herpes simplex* Virus Type 1 Reactivation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 21(2), 114-120. <https://doi.org/10.1089/jop.2005.21.114>
- Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L., & Marr, K. A. (2006). Dectin-1 and TLRs Permit Macrophages to Distinguish between Different *Aspergillus fumigatus* Cellular States. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3717-3724. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3717>
- Giovannoni, F., Ladelfa, M. F., Monte, M., Jans, D. A., Hemmerich, P., & García, C. (2019). Dengue Non-structural Protein 5 Polymerase Complexes With Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Isoforms III and IV to Disrupt PML-Nuclear Bodies in Infected Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 284. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00284>
- Gómez, R. M., Jaquenod de Giusti, C., Sanchez Vallduvi, M. M., Frik, J., Ferrer, M. F., & Schattner, M. (2011). Junín virus. A XXI century update. *Microbes and Infection*, 13(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.12.006>
- Greenway, D. J., Rugiero, H. R., Parodi, A. S., Frigerio, M., Rivero, E., Barrera, J. M. de la, Garzon, F., Boxaca, M., Mettler, N., Guerrero, L. B. de, & Nota, N. (1959). Epidemic Hemorrhagic Fever in Argentina. *Public Health Reports (1896-1970)*, 74(11), 1011. <https://doi.org/10.2307/4590657>
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, 11, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>

- Hinson, E. R., Joshi, N. S., Chen, J. H., Rahner, C., Jung, Y. W., Wang, X., Kaech, S. M., & Cresswell, P. (2010). Viperin Is Highly Induced in Neutrophils and Macrophages during Acute and Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *The Journal of Immunology*, *184*(10), 5723-5731. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903752>
- Hsi, L. C., Joon Baek, S., & Eling, T. E. (2000). Lack of Cyclooxygenase-2 Activity in HT-29 Human Colorectal Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research*, *256*(2), 563-570. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4863>
- Huang, C., Kolokoltsova, O. A., Yun, N. E., Seregin, A. V., Ronca, S., Koma, T., & Paessler, S. (2015). Highly Pathogenic New World and Old World Human Arenaviruses Induce Distinct Interferon Responses in Human Cells. *Journal of Virology*, *89*(14), 7079-7088. <https://doi.org/10.1128/JVI.00526-15>
- Jaén, R. I., Prieto, P., Casado, M., Martín-Sanz, P., & Boscá, L. (2018). Post-translational modifications of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 in colorectal cancer: An update. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(48), 5454-5461. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i48.5454>
- Jahan, S., Khaliq, S., Ijaz, B., Ahmad, W., & Hassan, S. (2011). Role of HCV Core gene of genotype 1a and 3a and host gene Cox-2 in HCV-induced pathogenesis. *Virology Journal*, *8*(1), 155. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-155>
- Jemielity, S., Wang, J. J., Chan, Y. K., Ahmed, A. A., Li, W., Monahan, S., Bu, X., Farzan, M., Freeman, G. J., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H., & Choe, H. (2013). TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathogens*, *9*(3), e1003232. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003232>
- Ju, Z., Li, M., Xu, J., Howell, D. C., Li, Z., & Chen, F.-E. (2022). Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(6), 2790-2807. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.01.002>

- Kang, Y.-J., Mbonye, U. R., DeLong, C. J., Wada, M., & Smith, W. L. (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in Lipid Research*, 46(2), 108-125.  
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.01.001>
- Kawabata, H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>
- Konturek, P. C., Kania, J., Burnat, G., Hahn, E. G., & Konturek, S. J. (2005). Prostaglandins as Mediators of Cox-2 Derived Carcinogenesis in Gastrointestinal Tract. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 2005*, 56, Supp 5, 57-73.
- Lee, S. M. Y., Gai, W. W., Cheung, T. K. W., & Peiris, J. S. M. (2011). Antiviral effect of a selective COX-2 inhibitor on H5N1 infection in vitro. *Antiviral Research*, 91(3), 330-334. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.011>
- Lejal, N., Tarus, B., Bouguyon, E., Chenavas, S., Bertho, N., Delmas, B., Ruigrok, R. W. H., Di Primo, C., & Slama-Schwok, A. (2013). Structure-Based Discovery of the Novel Antiviral Properties of Naproxen against the Nucleoprotein of Influenza A Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2231-2242.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02335-12>
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.-D., Seidah, N. G., & Garten, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12701-12705.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.221447598>
- Lewandowska-Polak, A., Brauncajs, M., Jarzębska, M., Pawełczyk, M., Kurowski, M., Makowska, J., & Kowalski, M. L. (2019). Parainfluenza virus infection enhances NSAIDs–induced inhibition of PGE2 generation and COX-2 expression in human airway epithelial cells. *Advances in Medical Sciences*, 64(2), 338-343.  
<https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.04.004>
- Lin, C.-K., Tseng, C.-K., Wu, Y.-H., Liaw, C.-C., Lin, C.-Y., Huang, C.-H., Chen, Y.-H., & Lee, J.-C. (2017). Cyclooxygenase-2 facilitates dengue virus replication and serves as a



- potential target for developing antiviral agents. *Scientific Reports*, 7(1), 44701.  
<https://doi.org/10.1038/srep44701>
- Liou, J.-T., Chen, Z.-Y., Ho, L.-J., Yang, S.-P., Chang, D.-M., Liang, C.-C., & Lai, J.-H. (2008). Differential effects of triptolide and tetrandrine on activation of COX-2, NF- $\kappa$ B, and AP-1 and virus production in dengue virus-infected human lung cells. *European Journal of Pharmacology*, 589(1-3), 288-298.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.04.056>
- Liou, J.-Y., Aleksic, N., Chen, S.-F., Han, T.-J., Shyue, S.-K., & Wu, K. K. (2005). Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: Implication in apoptosis resistance. *Experimental Cell Research*, 306(1), 75-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.01.011>
- Lu, L., Zhang, Q., Wu, K., Chen, X., Zheng, Y., Zhu, C., & Wu, J. (2015). Hepatitis C virus NS3 protein enhances cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 through ERK/p38/NF- $\kappa$ B signal cascade. *Cancer Letters*, 356(2), 470-478. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.027>
- Lucido, M. J., Orlando, B. J., Vecchio, A. J., & Malkowski, M. G. (s. f.). Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. 2016.
- Lucido, M. J., Orlando, B. J., Vecchio, A. J., & Malkowski, M. G. (2016). Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. *Biochemistry*, 55(8), 1226-1238.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01378>
- Luu, V. T., Phan, S., & Jin, Z.-Q. (2022). Dedifferentiation of Human Cardiac Myofibroblasts Is Independent of Activation of COX-2/PGE2 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3023. <https://doi.org/10.3390/ijms23063023>
- Martinez, M. G., Bialecki, M. A., Belouzard, S., Cordo, S. M., Candurra, N. A., & Whittaker, G. R. (2013). Utilization of human DC-SIGN and L-SIGN for entry and infection of

- host cells by the New World arenavirus, Junín virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(3), 612-617.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.106>
- Martinez, M. G., Cordo, S. M., & Candurra, N. A. (2007). Characterization of Junín arenavirus cell entry. *Journal of General Virology*, 88(6), 1776-1784.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.82808-0>
- Martínez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., García-Sastre, A., & de la Torre, J. C. (2007). Differential Inhibition of Type I Interferon Induction by Arenavirus Nucleoproteins. *Journal of Virology*, 81(22), 12696-12703. <https://doi.org/10.1128/JVI.00882-07>
- Melcon, M. O., Somoza, M. J., & Melcon, C. M. (2022). Fiebre hemorrágica argentina: Complicaciones neurológicas. *Neurología Argentina*, 14(1), 13-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2021.04.003>
- Meng, S., Zhou, Z., Chen, F., Kong, X., Liu, H., Jiang, K., Liu, W., Hu, M., Zhang, X., Ding, C., & Wu, Y. (2012). Newcastle disease virus induces apoptosis in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 317(1), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.008>
- Michael Garavito, R., Malkowski, M. G., & DeWitt, D. L. (2002). The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 129-152. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00026-6)
- Mukhopadhyay, D., Houchen, C. W., Kennedy, S., Dieckgraefe, B. K., & Anant, S. (2003). Coupled mRNA Stabilization and Translational Silencing of Cyclooxygenase-2 by a Novel RNA Binding Protein, CUGBP2. *Molecular Cell*, 11(1), 113-126.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00012-1)
- Nemeth, J. F., Hochensang, G. P., Marnett, L. J., & Caprioli, R. M. (2001). Characterization of the Glycosylation Sites in Cyclooxygenase-2 Using Mass Spectrometry. *Biochemistry*, 40(10), 3109-3116. <https://doi.org/10.1021/bi002313c>
- Ong, S. W. X., Tan, W. Y. T., Chan, Y., Fong, S., Renia, L., Ng, L. F., Leo, Y., Lye, D. C., & Young, B. E. (2020). Safety and potential efficacy of cyclooxygenase-2 inhibitors in

coronavirus disease 2019. *Clinical & Translational Immunology*, 9(7).

<https://doi.org/10.1002/cti2.1159>

- Patil, R. H., Naveen Kumar, M., Kiran Kumar, K. M., Nagesh, R., Kavya, K., Babu, R. L., Ramesh, G. T., & Chidananda Sharma, S. (2018). Dexamethasone inhibits inflammatory response via down regulation of AP-1 transcription factor in human lung epithelial cells. *Gene*, 645, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.024>
- Peña Cárcamo, J. R., Morell, M. L., Vázquez, C. A., Vatansever, S., Upadhyay, A. S., Överby, A. K., Cordo, S. M., & García, C. C. (2018). The interplay between viperin antiviral activity, lipid droplets and Junín mammarenavirus multiplication. *Virology*, 514, 216-229. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.012>
- Pinschewer, D. D., Perez, M., & De La Torre, J. C. (2005). Dual Role of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus Intergenic Region in Transcription Termination and Virus Propagation. *Journal of Virology*, 79(7), 4519-4526. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4519-4526.2005>
- Pryke, K. M., Abraham, J., Sali, T. M., Gall, B. J., Archer, I., Liu, A., Bambina, S., Baird, J., Gough, M., Chakhtoura, M., Haddad, E. K., Kirby, I. T., Nilsen, A., Streblow, D. N., Hirsch, A. J., Smith, J. L., & DeFilippis, V. R. (2017). A Novel Agonist of the TRIF Pathway Induces a Cellular State Refractory to Replication of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *mBio*, 8(3), e00452-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00452-17>
- Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P. J., Nunberg, J. H., Andrews, N. C., Farzan, M., & Choe, H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*, 446(7131), 92-96. <https://doi.org/10.1038/nature05539>
- Radoshitzky, S. R., Bào, Y., Buchmeier, M. J., Charrel, R. N., Clawson, A. N., Clegg, C. S., DeRisi, J. L., Emonet, S., Gonzalez, J.-P., Kuhn, J. H., Lukashevich, I. S., Peters, C. J., Romanowski, V., Salvato, M. S., Stenglein, M. D., & de la Torre, J. C. (2015). Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Archives of Virology*, 160(7), 1851-1874. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2418-y>

- Radoshitzky, S. R., & de la Torre, J. C. (2019). Human Pathogenic Arenaviruses (Arenaviridae). En *Encyclopedia of Virology* (pp. 507-517). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00014-X>
- Raman, P., Madhavpeddi, L., & Gonzales, R. J. (2018). Palmitate induces glycosylation of cyclooxygenase-2 in primary human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 314(5), C545-C553.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00254.2017>
- Ramer, R., Walther, U., Borchert, P., Laufer, S., Linnebacher, M., & Hinz, B. (2013). Induction but not inhibition of COX-2 confers human lung cancer cell apoptosis by celecoxib. *Journal of Lipid Research*, 54(11), 3116-3129.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.M042283>
- Riendeau, D., Percival, M. D., Brideau, C., Charleson, S., Dube, D., Ethier, D., Friesen, R. W., Gordon, R., Greig, G., Guay, J., Mancini, J., Ouellet, M., Wong, E., Xu, L., Boyce, S., Visco, D., Girard, Y., Prasit, P., Zamboni, R., ... Young, R. N. (2001). *Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile and Comparison with Other Agents That Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2*.
- Ritter, J. M., Harding, I., & Warren, J. B. (2009). Precaution, cyclooxygenase inhibition, and cardiovascular risk. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(10), 503-508.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.007>
- Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (2003). Mechanism of Free Radical Oxygenation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cyclooxygenases. *ChemInform*, 34(32).  
<https://doi.org/10.1002/chin.200332277>
- Sadasivam, K., Salgado Moran, G., Mendoza-Huizar, L. H., Cardona Villada, W., Gerli Candia, L., Meneses-Olmedo, L. M., & Cuesta Hoyos, S. (2020). Theoretical investigation of the molecular structure and molecular docking of Etoricoxib. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 65(2), 4804-4806. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072020000204804>

- Saito, T., Hattori, T., Okuya, K., Manzoor, R., Miyamoto, H., Kajihara, M., & Takada, A. (2022). Molecular Mechanisms Underlying the Cellular Entry and Host Range Restriction of Lujo Virus. *mBio*, 13(1), e03060-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03060-21>
- Sarute, N., & Ross, S. R. (2017). New World Arenavirus Biology. *Annual Review of Virology*, 4(1), 141-158. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-042001>
- Schwab, J. M., Schluesener, H. J., Meyermann, R., & Serhan, C. N. (2003). COX-3 the enzyme and the concept: Steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(5), 339-343. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.07.003>
- Sevigny, M. B., Li, C.-F., Alas, M., & Hughes-Fulford, M. (2006). Glycosylation regulates turnover of cyclooxygenase-2. *FEBS Letters*, 580(28-29), 6533-6536. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.073>
- Shaftel, S. S., Olschowka, J. A., Hurley, S. D., Moore, A. H., & O'Banion, M. K. (2003). COX-3: A splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Molecular Brain Research*, 119(2), 213-215. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.09.006>
- Shao, J., Liang, Y., & Ly, H. (2015). Human Hemorrhagic Fever Causing Arenaviruses: Molecular Mechanisms Contributing to Virus Virulence and Disease Pathogenesis. *Pathogens*, 4(2), 283-306. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020283>
- Shao, J., Sheng, H., Inoue, H., Morrow, J. D., & DuBois, R. N. (2000). Regulation of Constitutive Cyclooxygenase-2 Expression in Colon Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33951-33956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002324200>
- Shelby, B. D., Nelson, A., & Morris, C. (2005).  $\gamma$ -Herpesvirus neoplasia: A growing role for COX-2. *Microscopy Research and Technique*, 68(3-4), 120-129. <https://doi.org/10.1002/jemt.20226>
- Sil, S., & Ghosh, T. (2016). Cox-2 Plays a Vital Role in the Impaired Anxiety Like Behavior in Colchicine Induced Rat Model of Alzheimer Disease. *Behavioural Neurology*, 2016, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/1501527>

- Smith, W. L., Borgeat, P., & Fitzpatrick, F. A. (1991). *The eicosanoids: Cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways*.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 145-182.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
- Tapia-Ramírez, G., Lorenzo, C., Navarrete, D., Carrillo-Reyes, A., Retana, Ó., & Carrasco-Hernández, R. (2022). A Review of Mammarenaviruses and Rodent Reservoirs in the Americas. *EcoHealth*, 19(1), 22-39. <https://doi.org/10.1007/s10393-022-01580-0>
- Terrier, O., Dilly, S., Pizzorno, A., Chalupska, D., Humpolickova, J., Bouřa, E., Berenbaum, F., Quideau, S., Lina, B., Fève, B., Adnet, F., Sabbah, M., Rosa-Calatrava, M., Maréchal, V., Henri, J., & Slama-Schwok, A. (2021). Antiviral Properties of the NSAID Drug Naproxen Targeting the Nucleoprotein of SARS-CoV-2 Coronavirus. *Molecules*, 26(9), 2593. <https://doi.org/10.3390/molecules26092593>
- Tyagi, A., Kamal, M. A., & Poddar, N. K. (2020). Integrated Pathways of COX-2 and mTOR: Roles in Cell Sensing and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 693.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00693>
- Valenzuela, R., Pedrosa, M. A., Garrido-Gil, P., Labandeira, C. M., Navarro, G., Franco, R., Rodriguez-Perez, A. I., & Labandeira-Garcia, J. L. (2021). Interactions between ibuprofen, ACE2, renin-angiotensin system, and spike protein in the lung. Implications for COVID-19. *Clinical and Translational Medicine*, 11(4), e371.  
<https://doi.org/10.1002/ctm2.371>
- Wang, C., Wang, T., Hu, R., Dai, J., Liu, H., Li, N., Schneider, U., Yang, Z., & Wang, J. (2020). Cyclooxygenase-2 Facilitates Newcastle Disease Virus Proliferation and Is as a Target for Canthin-6-One Antiviral Activity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 987.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00987>
- Williams, C. S., & DuBois, R. N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270(3), G393-G400. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.3.G393>

- Wolff, S., Becker, S., & Groseth, A. (2013). Cleavage of the Junin Virus Nucleoprotein Serves a Decoy Function To Inhibit the Induction of Apoptosis during Infection. *Journal of Virology*, 87(1), 224-233. <https://doi.org/10.1128/JVI.01929-12>
- Yan, X., Hao, Q., Mu, Y., Timani, K. A., Ye, L., Zhu, Y., & Wu, J. (2006). Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates the expression of cyclooxygenase-2 by binding directly to regulatory elements for nuclear factor-kappa B and CCAAT/enhancer binding protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(8), 1417-1428. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.003>
- Yoshino, T., Kimoto, A., Kobayashi, S., Noguchi, M., Fukunaga, M., Hayashi, A., Miyata, K., & Sasamata, M. (2011). Pharmacological Profile of Celecoxib, a Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Arzneimittelforschung*, 55(07), 394-402. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296878>
- Yue, X., Yang, F., Yang, Y., Mu, Y., Sun, W., Li, W., Xu, D., Wu, J., & Zhu, Y. (2011). Induction of Cyclooxygenase-2 Expression by Hepatitis B Virus Depends on Demethylation-associated Recruitment of Transcription Factors to the Promoter. *Virology Journal*, 8(1), 118. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-118>
- Zhu, H., Cong, J.-P., Yu, D., Bresnahan, W. A., & Shenk, T. E. (2002). Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3932-3937. <https://doi.org/10.1073/pnas.052713799>