

**Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciencias Biológicas**



**Tesis de licenciatura de Ciencias Biológicas**

**Actividad antiviral e inmunomoduladora de la cianidina frente a los coronavirus**

**Autora: Paula Martelliti**

**Director: Carlos Bueno**

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.**

**Mes y año de presentación: mayo 2023**

# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abreviaturas y definiciones</b> .....	3
<b>Introducción</b>	
1. Coronavirus humano.....	5
2. Impacto y manifestaciones clínicas de las infecciones con coronavirus.....	8
3. Patología y respuesta inmune frente a la infección con coronavirus.....	9
4. Farmacoterapia para infecciones con coronavirus.....	10
5. Antivirales: blancos celulares como potencial blanco de acción.....	12
5.1. Actividad antiviral contra coronavirus en plantas medicinales.....	12
5.2. Flavonoides: Cianidina.....	14
<b>Hipótesis</b> .....	17
<b>Objetivo general</b>	
Objetivos específicos.....	17
<b>Materiales y Métodos</b>	
1. Línea celular.....	18
2. Virus.....	18
3. Reactivos.....	18
4. Ensayo de citotoxicidad celular.....	18
5. Ensayo de inmunofluorescencia.....	19

6. Inhibición del rendimiento viral.....	20
7. Ensayo virucida.....	20
8. Titulación viral por técnica de unidades formadoras de placas.....	21
9. Cuantificación de citoquinas.....	21
10. Análisis estadístico.....	21

## **Resultados**

1. Citotoxicidad de cianidina en células CRFK y calu-3.....	22
2. Efecto de cianidina sobre la expresión de la glicoproteína S en células calu-3 infectadas con SARS-CoV-2.....	22
3. Actividad antiviral de cianidina frente al CCoV en células CRFK.....	25
4. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de cianidina en macrófagos.....	28

<b>Discusión</b> .....	30
------------------------	----

<b>Bibliografía</b> .....	34
---------------------------	----

## Resumen

### **Actividad antiviral e inmunomoduladora de la cianidina frente a los coronavirus**

Los coronavirus humanos son causantes de múltiples enfermedades respiratorias a nivel mundial. En la actualidad hay disponibles antivirales como tratamiento y vacunas para prevenir la enfermedad, pero debido a la alta tasa de mutación de los coronavirus ambos pueden perder efectividad con la aparición de resistencia. Cianidina es un flavonoide que se encuentra en varias frutas e inhibe vías de señalización implicadas en la respuesta inmune del hospedador. También, trabajos previos en el laboratorio indican que posee actividad antiviral contra RSV.

La hipótesis propuesta es que cianidina inhibe la multiplicación de los coronavirus y modula la producción de citoquinas en condiciones de infección *in vitro*. Para ponerla a prueba se utilizaron técnicas de evaluación de citotoxicidad celular, inmunofluorescencia, inhibición del rendimiento viral, titulación viral por técnica de unidades formadoras de placas, y cuantificación de citoquinas mediante un ensayo de ELISA.

En este trabajo se ha demostrado que cianidina presenta actividad antiviral frente al coronavirus canino (CCoV) y SARS-CoV-2, en ausencia de citotoxicidad. Además, presenta propiedades inmunomoduladoras, ya que redujo los niveles de TNF- $\alpha$  en macrófagos infectados con CCoV. Por lo tanto, cianidina presenta actividad antiviral e inmunomoduladora frente a los coronavirus *in vitro*.

## **Antiviral and immunomodulatory activity of cyanidin against coronaviruses**

Human coronaviruses are the cause of multiple respiratory diseases worldwide. Currently, there are antivirals available as treatment, and vaccines to prevent the disease, but due to the high mutation rate of coronaviruses, both can lose effectiveness with the appearance of resistance. Cyanidin is a flavonoid that is found in several fruits and inhibits signaling pathways involved in the host's immune response. Also, previous works in the laboratory indicates that cyanidin has an antiviral activity against RSV.

The hypothesis proposed is that cyanidin inhibits the multiplication of coronaviruses and modulates the production of cytokines under *in vitro* infection conditions. To prove it, techniques of cellular cytotoxicity evaluation, immunofluorescence, inhibition of viral yield, viral titration using the technique of plate-forming units, and quantification of cytokines by ELISA essay were employed.

In this work, it has been demonstrated that cyanidin presents antiviral activity against canine coronavirus (CCoV) and SARS-CoV-2, in the absence of cytotoxicity. Moreover, it presents immunomodulatory properties, since it reduced the levels of TNF- $\alpha$  in macrophages infected with CCoV. Therefore, cyanidin presents antiviral and immunomodulatory activity against coronavirus *in vitro*.

## **Abreviaturas y definiciones**

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2 humana.

Calu-3: células epiteliales pulmonares humanas.

CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50, concentración de cianidina que produce una reducción del 50% de la viabilidad celular.

CE<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50, concentración de cianidina que reduce un 50% el rendimiento viral.

CoV: coronavirus.

CRFK: células epiteliales de riñón felino.

DE: desvío estándar.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos.

HCoV: coronavirus humano.

IFN: interferón.

ISGs: genes estimulados por interferón.

J774A.1: macrófagos murinos.

m.i.: multiplicidad de infección, proporción de viriones infecciosos en relación a la cantidad de células en un cultivo.

MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio.

NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B.

NLR: receptor de tipo NOD.

NO: óxido nítrico.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

p.i.: post-infección.

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos.

PRR: receptores de reconocimiento de patrones.

RLR: receptor de tipo RIG.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

S: *Spike*.

SARS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo.

SARS-CoV-2: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2.

SFB: suero fetal bovino.

TLR: receptor de tipo Toll.

UFP: unidades formadoras de placas.

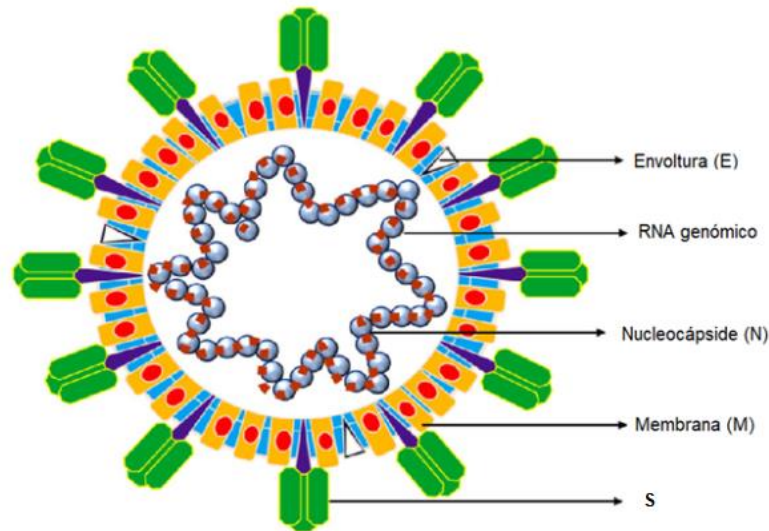
# Introducción

## 1. Coronavirus humanos

Los coronavirus (CoV) son un grupo diverso de virus zoonóticos de la subfamilia *Coronavirinae*, que junto con *Torovirinae*, conforman la familia *Coronaviridae*. Hasta la fecha, se conocen siete CoV que pueden causar infecciones respiratorias leves a graves en humanos que se encuentran agrupados en los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus*. Estos son el HCoV-229E, -OC43, -NL63 y -HKU1, que causan una enfermedad leve; y el SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, que causan una enfermedad más grave (Malik Y, 2020).

Una de las características de los CoV es que son capaces de adaptarse a nuevos entornos a través de mutaciones y su capacidad para recombinar con relativa facilidad y, por lo tanto, pueden alterar el rango de hospedadores y la afinidad por tejidos específicos de manera eficiente (Li F, 2016). En cuanto a su organización estructural, se caracterizan por ser partículas virales con un tamaño de entre 80 y 120 nm, que poseen un genoma de ARN simple cadena con polaridad positiva. Este genoma tiene un tamaño de entre 27 y 32 kb, con entre seis y diez marcos de lectura abiertos (ORF), un CAP en el extremo 5' y una cola poliadenilada en el 3'. El primer ORF comprende a los genes de las proteínas de replicación, mientras que el resto comprende genes para proteínas estructurales y proteínas accesorias (implicadas en la evasión de la respuesta inmune). En cuanto a su cápside, tiene una estructura helicoidal conformada por la proteína nucleocápside (N), y está rodeada por una envoltura compuesta por tres proteínas estructurales: la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la glicoproteína *Spike* (S) (Belouzard Set al., 2012) (Figura 1). Algunos *Betacoronavirus*, como SARS-CoV-2, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1, también poseen una proteína estructural llamada hemaglutinina esterasa (HE) (Liu D et al., 2021).



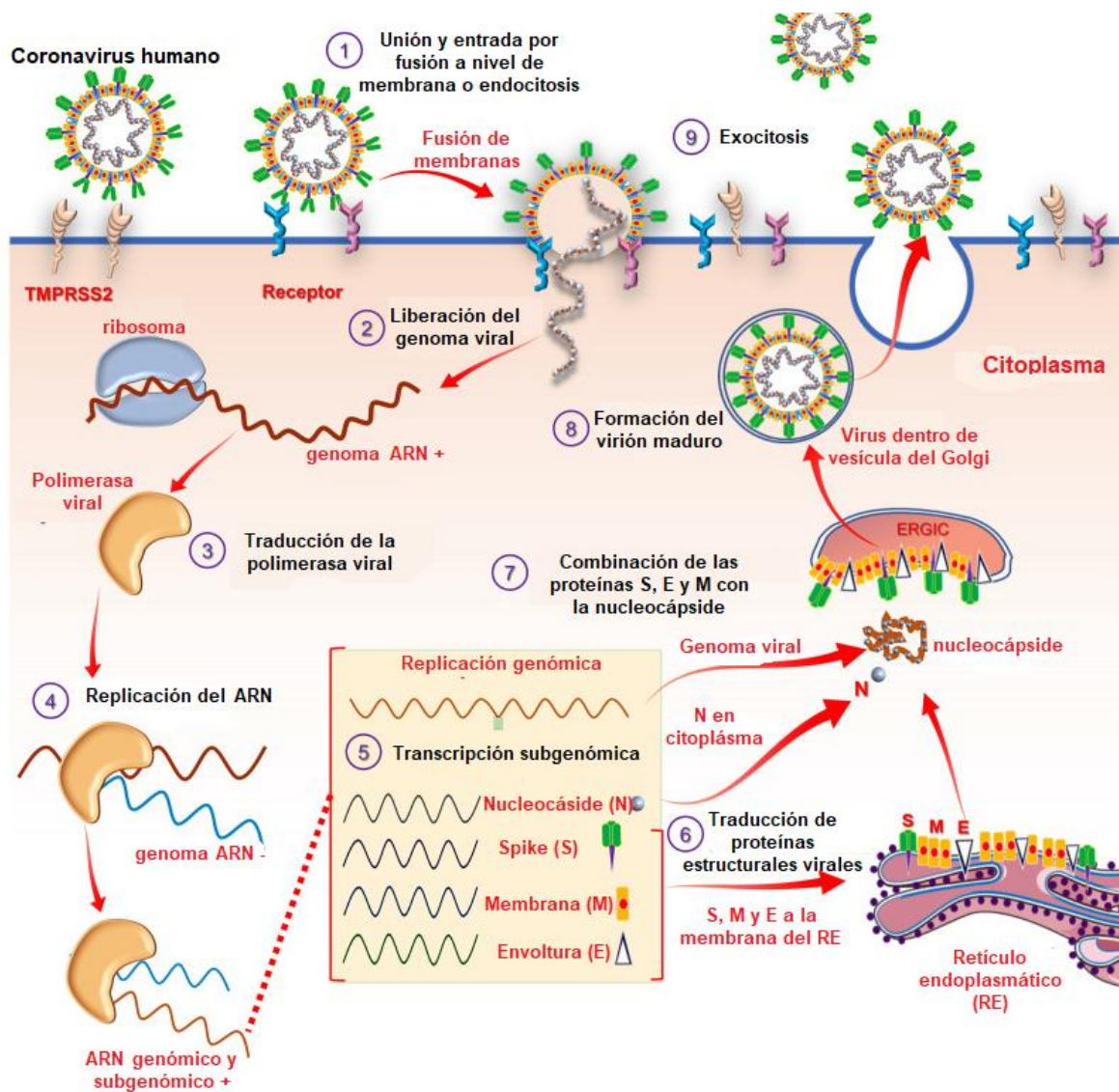


**Figura 1. Organización estructural de los CoV.** Tomado de Kirtipal N et al. (2020).

El ciclo de multiplicación de los CoV (Figura 2) comienza cuando el virus se adsorbe a la célula hospedadora. Esto ocurre mediante la unión de la glicoproteína S, proteína transmembrana de tipo I, a un receptor celular. La proteína S de todos los CoV se organiza en dos dominios: el N-terminal (S1), que es el de unión al receptor, y el C-terminal (S2), responsable de la fusión (Belouzard S et al., 2012).

El receptor celular al cual se une el virus es característico de cada tipo de CoV. En el caso de los SARS-CoV, SARS-CoV-2 y NL63, la proteína S se une al dominio de unión de la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (ACE2) que posee una expresión mayoritaria en intestino delgado, testículos, riñón, músculo cardíaco, colon y glándula tiroidea. De los tres CoV humanos (HCoV) que utilizan esta proteína como receptor, HCoV-NL63 es el que posee menor afinidad por ACE2, por lo que esto podría explicar que cause una enfermedad respiratoria más leve. En el caso MERS-CoV, se une mediante el receptor DDP4, dipeptidil peptidasa 4, el cual tiene un rol importante en el metabolismo de la glucosa, la apoptosis y el sistema inmune. Los HCoV-OC43 y HKU1 utilizan ácido siálico 9-O-acetilado como receptor. Por último, el HCoV-229E se une a la aminopeptidasa N, una proteína integral de membrana que se encuentra principalmente en riñón, intestino delgado, hígado y pulmón (Scialo F et al., 2020; Shang J et al., 2020; Turner A, 2013; Hulswit et al., 2019).

Luego de la adsorción, el virus puede ingresar a la célula hospedadora mediante endocitosis o fusión a nivel de membrana. Cuando el genoma viral ingresa al citoplasma del hospedador ocurre su traducción y luego su replicación. La traducción genera la síntesis de dos poliproteínas que al clivarse dan lugar a las proteínas virales no estructurales. Por otro lado, también ocurre una transcripción discontinua, la cual genera ARNs virales subgenómicos que al traducirse sintetizan las proteínas estructurales y accesorias. Las proteínas N, se sintetizan en el citoplasma mediante ribosomas libres, y luego se asocian a los nuevos genomas. En cambio, el resto de las proteínas estructurales y accesorias se traducen por ribosomas asociados al retículo endoplasmático. El ensamblado de la partícula viral ocurre en el compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, y se libera mediante vesículas secretoras. Finalmente, el virus sale de la célula mediante exocitosis (Kirtipal N et al., 2020; Liu D et al., 2021).



**Figura 2. Ciclo de multiplicación de HCoV en la célula hospedadora.** Tomado y traducido de Kirtipal N et al. (2020).

## **2. Impacto y manifestaciones clínicas de las infecciones con coronavirus**

Los coronavirus humanos (HCoV) son causantes de múltiples enfermedades respiratorias de severidad variable, entre ellas, el resfriado común, bronquiolitis y neumonía. Los HCoV 229E, OC43, NL63 y HKU1, están distribuidos globalmente y ocasionan enfermedades leves del tracto respiratorio superior en adultos. Entre el 15-30% de los resfriados comunes en adultos son causados por estos HCoV. En cambio, en infantes, niños pequeños, ancianos e inmunocomprometidos, pueden ocasionar

bronquiolitis y neumonía potencialmente fatales. Además de síntomas respiratorios, también pueden causar enfermedades intestinales y neurológicas (Liu D et al., 2021). El coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y SARS-CoV-2 tienden a causar una infección respiratoria aguda. Esta infección puede progresar a una neumonía potencialmente letal. En el caso del SARS-CoV, ocasionó una infección global en 2002-2003, con una tasa de letalidad del 10%. Por otra parte, MERS-CoV generó una epidemia en 2012, con un 35% de letalidad en la población. Recientemente, a finales del 2019, surgió en la ciudad Wuhan de China el SARS-CoV-2. Este se transmitió de manera rápida y superó el número de infecciones ocasionadas por SARS-CoV y MERS-CoV, generando la actual pandemia (Hu B et al., 2020; Kirtipal N et al., 2020). Hasta la fecha, se registraron más de 650 millones de casos y más de 6,5 millones de muertes alrededor del mundo (Organización Mundial de La Salud).

### **3. Patología y respuesta inmune frente a la infección con CoV**

Durante las infecciones con CoV ocurre una detección del virus por factores del huésped y se desencadena una respuesta inmune. Cuando la respuesta inmune generada es exacerbada, ocurre una inmunopatogénesis que ocasiona daño del tejido pulmonar, impedimento funcional y reducción de la capacidad pulmonar. La respuesta inmune innata del hospedador reconoce infecciones virales a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Entre los PRRs se hallan el receptor de tipo Toll (TLR), receptor de tipo RIG (RLR), receptor de tipo NOD (NLR), receptor de lectina de tipo C y moléculas receptoras libres en citoplasma (Li G et al., 2020).

Uno de los PAMPs más relevantes para CoV es el ARN de doble cadena. Este puede ser reconocido en el endosoma del huésped por TLR3, o en el citoplasma por RIG-I, la enzima helicasa MDA<sub>5</sub> o la quinasa PKR. El reconocimiento de los PAMPs virales promueve la síntesis de los interferones de tipo I o  $\alpha/\beta$  que activan la vía de señalización JAK-STAT, promoviendo la expresión de los genes estimulados por interferón (ISGs). Todo esto induce una respuesta inmune antiviral que restringe la replicación viral en la célula infectada y sus células vecinas (Li G et al., 2020; Kirtipal

N et al., 2020). Por otro lado, también ocurre la estimulación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que induce la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias (Lawrence T, 2009). Entre las citoquinas producidas en respuesta a SARS-CoV-2 se encuentran IL-6, IL-1, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CXCL1, CXCL2, y CCL2 (Khan S et al., 2021). En el caso de SARS-CoV y MERS-CoV se encuentran CXCL-10, CCL-5, CXCL-8, IFN- $\alpha$  y IL-6 (Kirtipal N et al., 2020). La tormenta de citoquinas causa el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que gatilla la destrucción de las células hospedadoras y resulta en una falla multiorgánica o muerte (Hariharan A et al., 2021; Moradian N et al., 2020).

#### **4. Farmacoterapia para infecciones con CoV**

Con el surgimiento de nuevos brotes y pandemias ocasionadas por HCoV, se han investigado diferentes opciones terapéuticas. Entre ellas, la utilización de compuestos antivirales y/o inmunomoduladores como tratamiento, y el desarrollo de vacunas para la prevención de la enfermedad.

En el caso de los antivirales, se realizaron estudios que se enfocaron en el uso de compuestos que tienen como blanco de acción proteínas virales esenciales para la infección. Con el surgimiento de la pandemia de COVID-19 se aprobó el uso de varios antivirales. Entre los antivirales utilizados en la actualidad se encuentran el remdesivir, el molnupiravir, el nirmatrelvir y ritonavir.

El remdesivir es una droga análoga de nucleósidos que inhibe a las ARN polimerasas virales, y es conocida por su alta efectividad *in vitro* contra el virus del ébola y otros virus de ARN. Es un fármaco bien tolerado, pero su administración se realiza por vía intravenosa. En el caso de los CoV, se detectó *in efecto* inhibitorio *in vitro* del remdesivir sobre la actividad de sus ARN polimerasas en investigaciones con SARS-CoV y MERS-CoV (Beigel J et al., 2020). En mayo del 2020, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) autorizó el uso del remdesivir para el tratamiento de pacientes con SARS-CoV-2 hospitalizados con una patología grave. La autorización del uso se basó en estudios en los que se observó una reducción en los tiempos de internación, pero no se hallaron diferencias significativas en los datos de mortalidad (Lopardo G, 2020; Simonis A et al., 2021).

En el caso del molnupiravir, es un pro-fármaco del análogo de nucleósidos  $\beta$ -D-N4-hidroxicitidina, y es otro inhibidor de ARN polimerasa viral, fue desarrollado originalmente contra el virus de la influenza. Su administración es por vía oral. A finales del 2021, su uso fue autorizado por la FDA para adultos infectados con SARS-CoV-2 con riesgo de progresión a una patología severa. Sin embargo, existe un riesgo teórico de que el molnupiravir sea metabolizado por la célula huésped humana e incorporado a su ADN del huésped, lo que provocaría mutaciones. Además, ha habido inquietudes sobre los efectos potenciales de molnupiravir en las tasas de mutación del SARS-CoV-2; en ese sentido, la FDA ha requerido que el fabricante controle las bases de datos genómicas para detectar la aparición de variantes del SARS-CoV-2 (COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. N.I.H., 2023). Debido a la falta de datos clínicos, tanto poblacionales como individuales, por ahora se desconocen los efectos perjudiciales del molnupiravir a largo plazo, en particular la genotoxicidad, el desarrollo de resistencia y la aparición de nuevas variantes (Organización Mundial de la Salud, OMS).

El nirmatrelvir, es un inhibidor de la proteasa de SARS-CoV-2 que se administra en combinación con el ritonavir, que potencia su farmacocinética (Paxlovid). Posee actividad antiviral *in vitro* para varios HCoV, gran selectividad y es seguro (Owen D et al., 2021; OMS). Su vía de administración es oral. Paxlovid constituye una mejor opción porque puede prevenir con mayor eficacia la hospitalización que los tratamientos alternativos, suscita menos dudas respecto de los perjuicios que el molnupiravir y es más fácil de administrar que el remdesivir y los anticuerpos, que requieren administración intravenosa (Organización Mundial de la Salud). Sin embargo, la aparición de mutaciones en la proteasa causante de la resistencia a Paxlovid son cada vez más frecuentes. Asimismo, se han informado rebotes virológicos y clínicos después de la interrupción de Paxlovid en pacientes inmunocompetentes. Este hallazgo es preocupante cuando se traduce a pacientes inmunocomprometidos, en quienes la eficacia de Paxlovid no se ha investigado formalmente en ensayos clínicos (Akinosoglou et al., 2022; COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. N.I.H., 2023; Focosi et al., 2023).

Por otra parte, durante la pandemia de COVID-19 se desarrollaron diversas vacunas con el objetivo de prevenir y frenar la alta tasa de mortalidad del SARS-CoV-2. Los tiempos de desarrollo de las vacunas contra SARS-CoV-2 se acortaron parcialmente debido a los estudios previos de vacunas contra SARS-CoV y MERS-CoV. Las vacunas analizadas y aprobadas en ensayos clínicos fueron clasificadas por la OMS según las siguientes categorías: vacunas inactivadas, vacunas de ARN, vacunas de vector viral, vacunas de virus atenuado, vacunas de ADN, vacunas VLP y vacunas de subunidades proteicas (Li M et al., 2022). De las 105 vacunas desarrolladas para prevención de la COVID-19, hasta la fecha fueron aprobadas por la OMS:

BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) y mRNA-1273 (Moderna), vacunas de ARNm; AZD1222 (AstraZeneca), Covishield (Serum Institute of India Pvt.Ltd), Ad26.COV2. S (Janssen) y Ad5-nCoV (CanSino), vacunas con adenovirus como vector; BBIBP-Corv (Sinopharm/BIBP), CoronaVac (Sinovac), COVAXIN (Bharat Biotech) y VLA2001 (Valneva), vacunas de virus inactivado; y Covovax (Serum Institute of India Pvt.Ltd) y Covovax (NOVAVAX), vacunas de subunidades proteicas.

En la actualidad, a pesar de la existencia de estas vacunas, continúa habiendo un porcentaje, aunque bajo, de vacunados infectados que requieren hospitalización. Por otra parte, debido a la alta tasa de error de la ARN polimerasa viral, el virus potencialmente podría adquirir mutaciones que le permitan evadir la respuesta inmune y afecten la efectividad de estas vacunas.

## **5. Antivirales: blancos celulares como potencial blanco de acción**

En la actualidad, la mayoría de los antivirales aprobados tienen blancos virales, resultando en una acción específica y selectiva. Una desventaja del uso de este tipo de antivirales es que, debido a la alta tasa de mutación de los virus, y en particular de los virus de ARN como los CoV, pueden dejar de ser efectivos ante la selección de mutaciones que le confieren resistencia a los mismos. Por esta razón, también es importante la búsqueda de nuevos antivirales que tengan blancos celulares, es decir, que actúen sobre factores del hospedador implicados en la replicación viral. Este tipo

de antivirales, aunque tienen menor selectividad, poseen una menor probabilidad de que se genere resistencia al mismo. Además, si el blanco celular participa en el ciclo de multiplicación de diversos virus, el antiviral tendría un amplio espectro de acción.

### **5.1. Actividad antiviral de plantas medicinales contra CoV**

Las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas para tratar varias enfermedades de tipo infecciosas o no infecciosas. Se estima que el 25% de los medicamentos utilizados comúnmente contienen componentes aislados de plantas.

En el pasado, la investigación de plantas como fuente para la obtención de antivirales era limitada debido a la falta de técnicas de separación apropiadas para la obtención de los componentes antivirales de las plantas. Actualmente, con el desarrollo de nuevas técnicas de separación se facilitó el estudio de compuestos de plantas como posibles antivirales (Mukhtar M et al., 2008).

En cuanto a la utilización de compuestos de plantas para el tratamiento de patologías ocasionadas por CoV, se han identificado nueve plantas con potencial efecto inmunomodulador, inmunoestimulante y antiviral contra los CoV, y cuatro de estos reportaron efectos en SARS-CoV-2 (Rojas J et al., 2021) Los resultados se detallan en la siguiente tabla:

Especie	Efecto antiviral de compuesto/preparado		
	Compuestos Bioactivos	CoV	Efecto antiviral
<i>Allium sativum</i> L.	17 compuestos Organosulfurados	SARS-CoV-2	Inhibe las proteínas: ACE2, PDB6LU7 (proteasa SARS-CoV-2)
<i>Allium cepa</i> L.	Quercetina	virus del pseudotipo HIV-luc / SARS-CoV	Inhibidor de la replicación viral y de 3CLpro (proteasa SARS-CoV-2)



<i>Cinnamomum zeylanicum Blume</i>	Cinnamaldehido	SARS-CoV-2	Inhibidor de HSPA5 (proteína de unión a inmunoglobulina)
<i>Citrus sinensis L.</i>	Hesperetin, naringenin, naringin	SARS-CoV-2	Inhibidor de ACE2
<i>Curcuma longa L.</i>	Curcumina	SARS-CoV	Inhibidor la replicación viral /Inhibidor del 3Clpro
<i>Punica granatum L.</i>	zumo de granada (93 % polifenoles)	Coronavirus MHV-A59	Inhibidor de la replicación viral
<i>Sambucus nigra L.</i>	Extracto etanólico de sauco	Virus de la bronquitis infecciosa (coronavirus tipo gamma)	Replicación viral temprana
<i>Sambucus Formosana Nakai</i>	-	HCoVNL63	Inhibidor de la replicación viral
<i>Vitis vinifera L.</i>	Resveratrol	MERS-CoV	Inhibidor de la replicación viral
<i>Zingiber officinale Rosc.</i>	6-Gigerol  6-Shogaol	SARS-CoV-2	- Inhibidor del ACE2, unión débil a proteasa MPRO  -Unión débil a proteasa MPRO

**Tabla 1. Actividad antiviral sobre CoV y efecto inmunomodulador por compuestos bioactivos de los alimentos.** Tomado de Rojas J et al. (2021).

## 5.2. Flavonoides: Cianidina

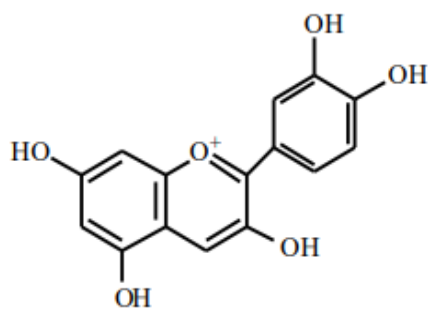
Los flavonoides son una familia de polifenoles que se encuentran en frutas, vegetales, bebidas y granos. En las plantas tienen un rol fundamental regulando el crecimiento de la planta y la interacción con los microbios comensales. En el humano tienen una función antioxidante ya que eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), y en algunas instancias son quelantes de iones de metales de transición. Estudios epidemiológicos asocian su

consumo con la reducción del riesgo coronario e infarto miocárdial y, prevención de neovascularización corneal (Rice-Evans, 2001).

Los flavonoides se clasifican según el nivel de oxidación de su anillo de carbono central, definiendo a las familias antocianidina, flavonol, flavanona y oligómeros de proantocianidina de flavanoles monoméricos (Rice-Evans C, 2001; Wang L et al., 2022). Dentro de la familia de las antocianidinas, se encuentra la cianidina (Figura 3), un metabolito secundario de plantas que es un colorante natural soluble en agua responsable de las pigmentaciones rojas, azules y moradas de los productos de las plantas. Posee múltiples beneficios farmacológicos, entre ellos, es un potente antioxidante y quelante de metales, y tiene propiedades antiinflamatorias, antivirales y anticarcinogénicas (Thummayot S et al., 2018). Estudios previos demostraron que la actividad antiinflamatoria de cianidina-3-glucósido de frutas y vegetales ocurre parcialmente mediante la supresión de la producción del óxido nítrico (NO) y de los niveles de TNF- $\alpha$  en varios tipos celulares, entre ellos, en células J774 y células endoteliales microvasculares humanas, fundamentalmente como consecuencia de la inhibición de la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Mittal M et al., 2014; Pergola C et al., 2006).

Por otra parte, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio revelan que cianidina presenta actividad virucida, antiviral e inmunomoduladora frente al RSV (virus sincicial respiratorio), *in vitro* e *in vivo* (Benedetti M, 2020; Benedetti M et al., 2019, 2021; Benedetti M et al., 2021).

Entonces, teniendo en cuenta que cianidina presenta actividad moduladora de la respuesta inmune frente a diversos estímulos y, además, actividad antiviral frente a RSV *in vitro* e *in vivo*, resulta de sumo interés el estudio de cianidina como potencial antiviral e inmunomodulador frente a los CoV. En ese sentido, los resultados previos en el laboratorio han demostrado que 25  $\mu$ g/ml de cianidina inhibe en un 95% la replicación de SARS-CoV-2 en la línea de células epiteliales pulmonares humanas calu-3, en ausencia de citotoxicidad.



**Figura 3. Estructura molecular de la cianidina.** 3,5,7,3',4'-Pentahidroxyflavilium, 2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxil-1-Benzopirilium (IUPAC). Tomado de Rice-Evans C (2001).

## **Hipótesis**

Cianidina inhibe la multiplicación de los CoV y modula la producción de citoquinas en condiciones de infección *in vitro*.

## **Objetivo General**

Evaluar la actividad antiviral e inmunomoduladora de cianidina frente a los CoV *in vitro*.

### **Objetivos específicos:**

- 1.- Evaluar el efecto de cianidina sobre la expresión de la glicoproteína S en células calu-3 infectadas con SARS-CoV-2.
- 2.-Determinar la actividad antiviral de la cianidina en la multiplicación del coronavirus canino (CCoV) en las células epiteliales de riñón felino (CRFK).
- 3.-Investigar la actividad inmunomoduladora de citoquinas frente a la infección con el CCoV en macrófagos murinos (J774A.1).

## **Materiales y métodos**

### **1. Líneas celulares**

Las líneas celulares CRFK (proveniente de células epiteliales de riñón felino), y calu-3 (proveniente de adenocarcinoma de pulmón humano) fueron provistas por el Dr. Carlos Palacios y la Dra. Fernanda Elias (Fundación Pablo Cassará-Buenos Aires, Argentina), respectivamente. Estas fueron crecidas en medio D-MEM (gibco) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) (gibco). La línea celular J774A.1 (proveniente de macrófagos murinos) fue crecida en medio RPMI (gibco) con 10% SFB.

### **2. Virus**

El SARS-CoV-2 (cepa Wuhan) fue provisto por el Dr. Jorge Quarlieri (INBIRS). El CCoV fue provisto por el Dr. Carlos Palacios (Fundación Pablo Cassará-Buenos Aires, Argentina).

La infección con SARS-CoV-2 se realizó en un BSL-3 por el Dr. Carlos Bueno en el Instituto Malbrán, y luego se trabajó con las células infectadas ya fijadas en el Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. En el caso del CCoV se realizó todo el trabajo en el Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, debido a que para este virus es necesario un nivel de bioseguridad menor que en el caso de SARS-CoV-2 (BSL-2).

### **3. Reactivos**

Cianidina fue adquirida en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CAS 528-58-5) con una pureza  $\geq 98$  %. El inhibidor específico de la vía de señalización intracelular NF- $\kappa$ B BAY11-7085 se adquirió en InvivoGen.

### **4. Ensayo de citotoxicidad**

Para determinar la citotoxicidad del flavonoide cianidina, se realizó el ensayo colorimétrico de la sal de tetrazolio 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide, MTT (Sigma). Cuando la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa reacciona con el MTT se produce el formazán, un producto de color azul. Esta reacción ocurre únicamente en células vivas, por lo que la cantidad del producto coloreado es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en la muestra (Denizot & Lang, 1986).

Para llevar a cabo este ensayo se trataron células confluentes en una microplaca de 96 pocillos con distintas concentraciones de cianidina. Luego de 24 h de incubación a 37 °C en estufa con 4 % CO<sub>2</sub>, se agregaron 10 µl de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y se incubó durante 2 h a 37 °C. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes, se solubilizó el formazán con 200 µl de etanol por pocillo, y se midió la absorbancia con un lector de microplacas (BioTek ELx808) a 570 nm (longitud de onda de prueba) y a 630 nm (longitud de onda de referencia). Los resultados fueron expresados como porcentajes de viabilidad de las células tratadas con respecto a las células sin tratar.

A partir de estos resultados se buscó determinar la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>), concentración de cianidina que produce una reducción del 50% de la viabilidad celular, como la relación entre el promedio de los triplicados de la absorbancia de los cultivos tratados sobre el promedio de los triplicados de la absorbancia de los controles celulares sin tratar x 100%.

##### 5. Ensayo de inmunofluorescencia

Las células crecidas en cubreobjetos fueron fijadas con metanol a -20 °C durante 10 min. Luego, se lavaron con PBS tres veces durante 10 minutos en agitación, y se incubaron con una dilución 1/300 del anticuerpo primario anti-S de SARS-CoV-2 (Sigma-Aldrich) policlonal hecho en conejo, durante 30 min en cámara húmeda a 37 °C. Finalizado este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS en agitación por 10 min. Luego se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo secundario anti-conejo (FluoroLink™ Cy™3-GE Healthcare) por 30 min a 37 °C. Se realizaron otros 3 lavados con PBS y luego se trataron las células con 250 µl de DAPI para marcar los núcleos. A continuación, se hicieron 3 lavados de PBS seguidos de 2 lavados con agua destilada. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados con glicerina tamponada y DABCO y observados en un microscopio de epifluorescencia. Se

analizaron las fotos con el programa *ImageJ*, a partir de cinco campos distintos por muestra. En cada campo se contaron la cantidad de células totales teñidas con DAPI y las células que expresaron S. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de células que expresaron S en cada condición.

## 6. Inhibición del rendimiento viral

Por un lado, se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral pre-tratamiento. Para esto, se trataron células CRFK crecidas confluentes en una microplaca de 24 pocillos con cianidina (25 µg/ml) durante 60 min, se quitó el medio y se infectó con 0,1 ml de CCoV a una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1. Luego, de 1 h de incubación, se quitó el inóculo y se incubó con medio fresco durante 24 h a 37 °C en la estufa de CO<sub>2</sub>. Por último, se cosechó el virus y se cuantificó la infectividad viral por el método de unidades formadoras de placas.

Por otra parte, se realizaron ensayos de inhibición post-tratamiento. Se crecieron células CRFK en microplacas de 24 pocillos, se infectaron con CCoV (m.i.= 0,1), y se trataron con cianidina (25 µg/ml). Luego de 24 h de incubación, se cosechó el virus y se cuantificó la infectividad viral por el método de unidades formadoras de placas. Luego, este experimento se repitió con diversas de concentraciones de cianidina (1.5, 3, 6, 12 y 25 µg/ml) para poder realizar una curva dosis-respuesta y determinar la concentración citotóxica 50 (CE<sub>50</sub>), concentración de cianidina que reduce un 50% el rendimiento viral.

Como controles para los ensayos de inhibición del rendimiento viral, por un lado, se trataron las células infectadas con un inhibidor específico de la vía de señalización intracelular NF-κB (BAY11-7085, Fabricante y país), y por otro, como control viral, se infectaron las células CRFK con CCoV sin agregado de tratamiento.

## 7. Ensayo virucida

Se incubaron 50 µl de una suspensión de CCoV conteniendo 10<sup>5</sup> unidades formadoras de placas de lisis (UFP) con 50 µl de distintas concentraciones de cianidina durante 2 h en la estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Luego del tiempo de incubación, se hicieron diluciones seriadas al 1/10 para poder cuantificar por el método de unidades

formadoras de placas. Como control, se incubaron 50 µl de medio sin droga con 50 µl de CCoV (control viral).

#### 8. Titulación viral por técnica de unidades formadoras de placas

Se infectaron monocapas de células CRFK con 0,1 ml de diluciones seriadas al décimo de las muestras a titular. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C en una atmósfera con 4% de CO<sub>2</sub>, se retiraron los inóculos y se cubrieron las células con 0,5 ml de medio de plaqueo (MEM en doble concentración, 2X, suplementado con 2 % de SFB inactivado, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4 % (Sigma-Aldrich). Luego de incubar las placas a 37 °C durante 72 h, se fijaron las células agregando 0,5 ml de formol 10% a cada pocillo y se las tiñeron con cristal violeta. Finalmente, se contaron las placas formadas y se calcularon los títulos virales para cada condición

$$\left( \frac{\text{Promedio número de placas de lisis}}{\text{Volumen inóculo x dilución}} \right)$$

#### 9. Cuantificación de citoquinas

Las células J774A.1 fueron crecidas hasta confluentes en una microplaca de 24 pocillos e infectadas con 0,1 ml de CCoV (m.i.= 0,1). Se incubó durante 1 h a 37 °C en la estufa de CO<sub>2</sub>, y luego del tiempo de adsorción se descartó el inóculo viral y las células se incubaron con cianidina (25 µg/ml) durante 24 h a 37 °C. Como controles, se trataron las células J774A.1 infectadas con BAY11-7085 (10 µg/ml) (control de la actividad inmunomoduladora), o con medio fresco (control viral); y se les agregó medio fresco a células J774A.1 sin infectar (control celular).

Para la cuantificación de las citoquinas en el sobrenadante, se utilizaron kits comerciales de ELISA (BD OptEIA™, Becton–Dickinson) siguiendo las instrucciones de uso del mismo. Luego, se realizó lectura de las microplacas en el espectrofotómetro (BioTek ELx808). Se midieron las absorbancias a 450 nm (longitud de onda de prueba) y a 570 nm (longitud de onda de referencia).

#### 10. Análisis estadístico

Las CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub> fueron calculadas a partir de curvas dosis-respuesta usando el software GraphPad Prism. La significancia estadística fue calculada mediante el



análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Tukey.  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

## Resultados

### 1. Citotoxicidad de cianidina en células CRFK y calu-3

Con el objeto de estudiar el efecto antiviral de la cianidina frente a los CoV, primero se determinó la citotoxicidad del compuesto en las líneas celulares CRFK y calu-3, con el ensayo colorimétrico MTT. Los resultados obtenidos demuestran que aún en la máxima concentración evaluada de cianidina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), no se alcanzó una reducción de la viabilidad celular igual o mayor a un 50% en ninguna de las líneas celulares. Por lo tanto, la  $CC_{50}$  de la cianidina en células CRFK y calu-3 fue mayor a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

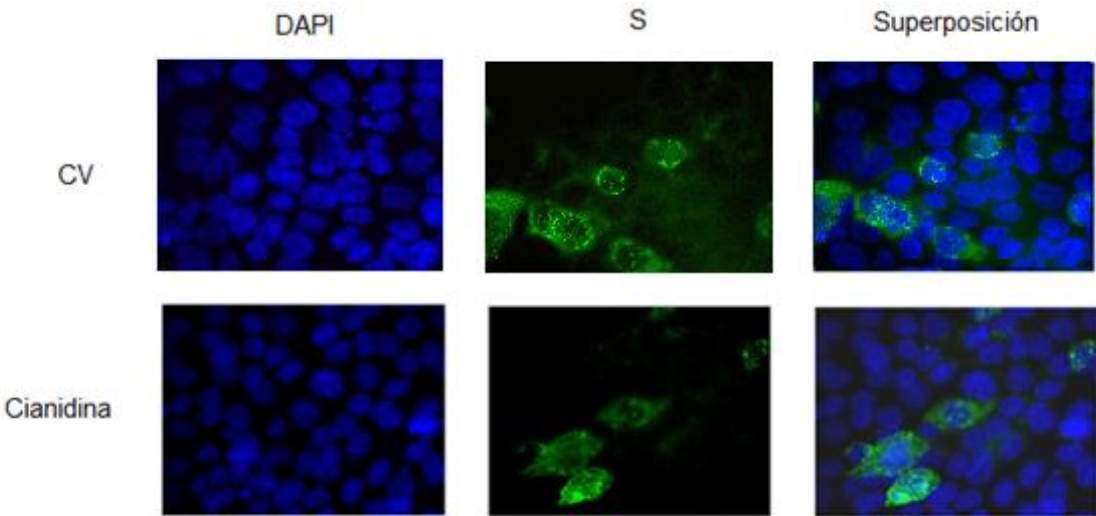
Teniendo en cuenta dichos resultados y resultados previos obtenidos en el laboratorio que muestran que la  $CC_{50}$  de cianidina en células J774A.1 también fue mayor a 100  $\mu\text{g/ml}$ , en los ensayos realizados posteriormente se utilizaron concentraciones iguales o menores a 100  $\mu\text{g/ml}$  de cianidina en células CRFK, calu-3 y J774A.1.

### 2. Efecto de cianidina sobre la expresión de la glicoproteína S en células calu-3 infectadas con SARS-CoV-2

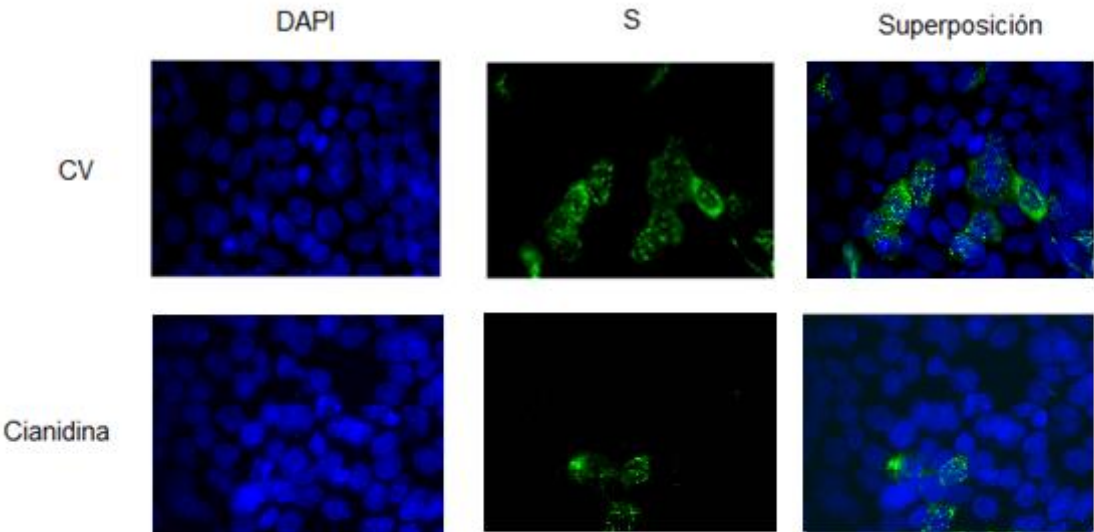
Resultados previos obtenidos en el laboratorio habían demostrado que cianidina reduce significativamente la replicación de SARS-CoV-2 en las células calu-3. Entonces, con el objeto de profundizar el estudio de la actividad antiviral frente a SARS-CoV-2, se evaluó si cianidina era capaz de afectar la expresión de la glicoproteína viral S mediante la técnica de IFI. Para ello, células calu-3 crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con SARS-CoV-2 (m.i.=0,1) y tratadas o no con cianidina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 18 y 24 h post-infección (p.i.). Luego, se analizó el porcentaje de células que expresan la proteína viral, relativizando con el número de células totales teñidas con DAPI (Figura 1).

En la Figura 1 se observa que un 17,9% y 19,6% de las células calu-3 sin tratar expresaron la proteína viral S a las 18 y 24 h, respectivamente. Si bien en las células tratadas con cianidina se evidenció una reducción en el número de células que expresaron la proteína viral S tanto a las 18 h como a las 24 h p.i., dicha reducción resultó ser estadísticamente significativa a las 24 h p.i.

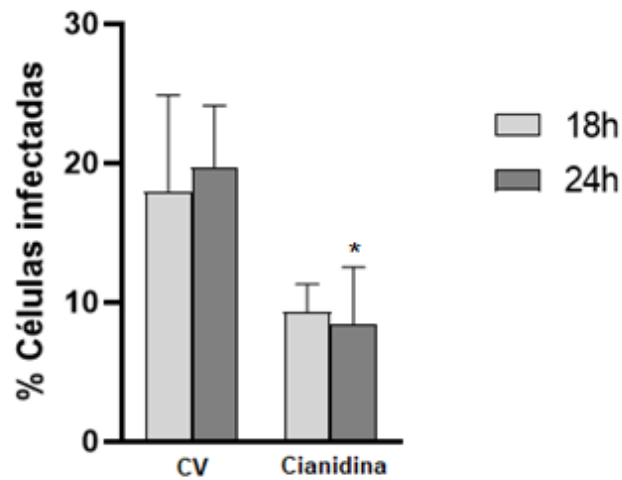
A)



B)



C)



**Figura 1. Efecto de cianidina sobre la expresión de la proteína viral S en células calu-3.** Células calu-3 fueron infectadas con SARS-CoV-2 y tratadas con 50 µg/ml de cianidina. Luego de 18 h (A) y 24 h (B) p.i., se determinó la expresión de la proteína S por IFI. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento 600X. El porcentaje de células SARS-CoV-2-positivas, se muestra como media ± DE (desvío estándar) (C). CV = Control de Virus. \* indica diferencias significativas respecto al control de virus ( $p < 0,05$ ). Los resultados corresponden al promedio de 5 repeticiones ± DE.

### 3. Actividad antiviral de cianidina frente al CCoV en células CRFK

Luego, con el objeto de investigar si cianidina presenta actividad antiviral de amplio espectro frente a los CoV, se evaluó la actividad antiviral de cianidina frente al CCoV en células CRFK. Para ello, se realizaron ensayos de inhibición del rendimiento viral tratando a las células CRFK con cianidina antes o después de la infección con CCoV. Como controles, por un lado, se trataron a las células infectadas con un inhibidor específico de la vía de señalización intracelular NF-κB (BAY11-7085), y por otro, como control viral, se infectaron células CRFK con CCoV sin agregado de tratamiento.

Entonces, en primer lugar, para evaluar el efecto del tratamiento con cianidina antes de la infección, células CRFK crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron tratadas con cianidina (25 µg/ml) o BAY 11-7085 (10 µg/ml) durante 60 min previo a

la infección con CCoV (m.i.=0,1), y a las 24 h post-infección se cosechó el virus y se tituló el rendimiento viral. En la Figura 2 se observa que el pre-tratamiento con cianidina y BAY 11-7085, no produjo reducción del título viral con respecto al control viral en ninguno de los dos tratamientos.

Por otro lado, para evaluar el efecto del tratamiento con cianidina después de la infección, las células CRFK crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con CCoV (m.i.= 0,1), luego tratadas con cianidina (25 µg/ml) o BAY 11-7085 (10 µg/ml), y se las incubó durante 24 h. El tratamiento con cianidina inhibió la replicación del CCoV cuando fue agregado post-infección a las células CRFK, mientras que el tratamiento con BAY 11-7085 no afectó la multiplicación del CCoV (Figura 3).

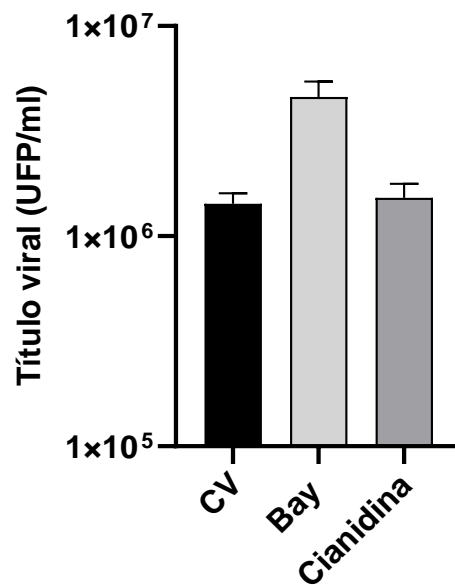
Por lo tanto, cianidina presentó actividad antiviral frente al CCoV en células CRFK exclusivamente cuando fue agregada post-infección.

Entonces, una vez verificada la actividad antiviral de cianidina post-infección, se procedió a establecer la  $CE_{50}$  de cianidina frente al CCoV en las células CRFK mediante una curva dosis-respuesta en estas condiciones de tratamiento. Para ello, células CRFK crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con CCoV (m.i.= 0,1) y tratadas con distintas concentraciones de cianidina durante 24 h. Se cosechó el virus y se tituló el rendimiento mediante el método de formación de placas en células CRFK. Se observó una inhibición de la multiplicación viral dependiente de la concentración (Figura 4). La  $CE_{50}$  obtenida fue de 7,6 µg/ml.

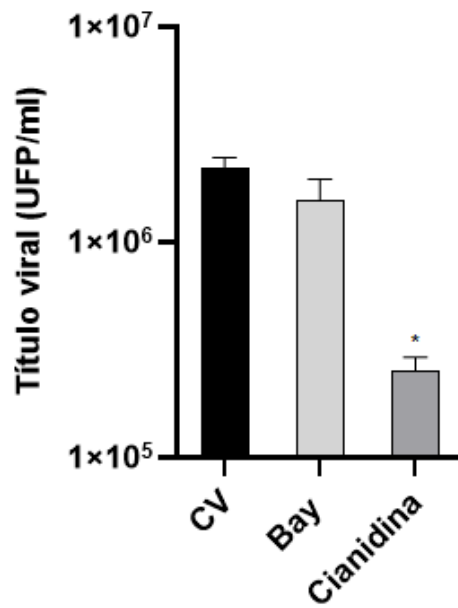
Con los valores obtenidos de  $CE_{50}$  y  $CC_{50}$  se puede calcular el valor del índice de selectividad (IS). Teniendo en cuenta que para calcular el IS se consideró como  $CC_{50}$  la máxima concentración evaluada de cianidina (100 µg/ml), en la que no se evidenció toxicidad, el IS probablemente sea más elevado. Entonces, el índice de selectividad obtenido fue mayor a 13,2 al calcularse con la siguiente ecuación:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CE_{50}} = \frac{100 \mu g/ml}{7,6 \mu g/ml} = 13,2$$

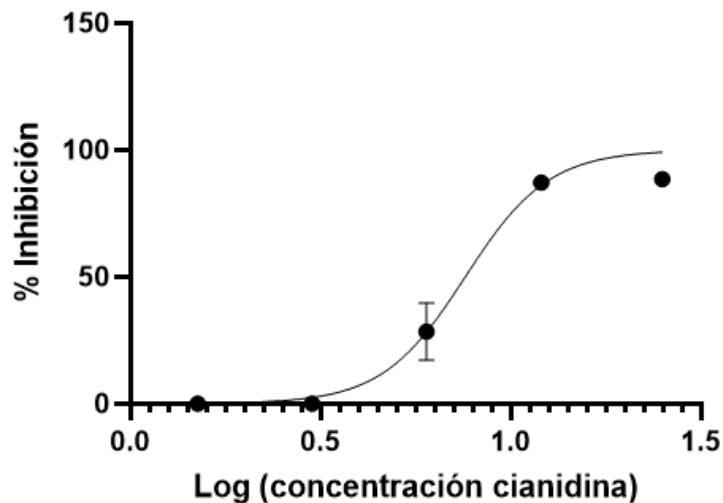
Luego, con el objeto de evaluar si además de su efecto antiviral, cianidina era capaz de inactivar las partículas virales (efecto virucida), se incubaron volúmenes iguales de una suspensión de CCoV conteniendo  $10^5$  UFP totales con distintas diluciones de cianidina a 37 °C. Posteriormente se determinó la infectividad viral remanente por el método de formación de placas en células CRFK. En este caso, no se observó reducción del título viral respecto al control viral ( $3,3 \times 10^5$  UFP/ml) con ninguno de los tratamientos evaluados, cianidina 50  $\mu$ g/ml ( $3,8 \times 10^5$  UFP/ml) y 25  $\mu$ g/ml ( $4,7 \times 10^5$  UFP/ml).



**Figura 2. Efecto de cianidina frente a la multiplicación del CCoV en células CRFK tratadas antes de la infección con CCoV.** Células CRFK fueron tratadas o no (CV) con cianidina (25  $\mu$ g/ml) o BAY11-7085 y, 60 min después, infectadas con CCoV (m.i.=0,1) en ausencia de compuesto. Luego de la absorción se colocó medio sin compuesto y se incubó durante 24 h a 37 °C. El rendimiento viral se determinó mediante el ensayo de formación de placas. CV= Control viral. Los resultados corresponden al promedio de 2 repeticiones  $\pm$  DE.



**Figura 3. Efecto de cianidina frente a la multiplicación del CCoV en células CRFK tratadas después de la infección con CCoV.** Células CRFK fueron infectadas con CCoV (m.i.=0,1) y tratadas o no (CV) con cianidina (25 µg/ml) o BAY11-7085, luego de 24 h de incubación a 37 °C en presencia de compuesto, se determinó el rendimiento viral mediante el ensayo de formación de placas. Los resultados corresponden al promedio de 2 repeticiones ± DE.

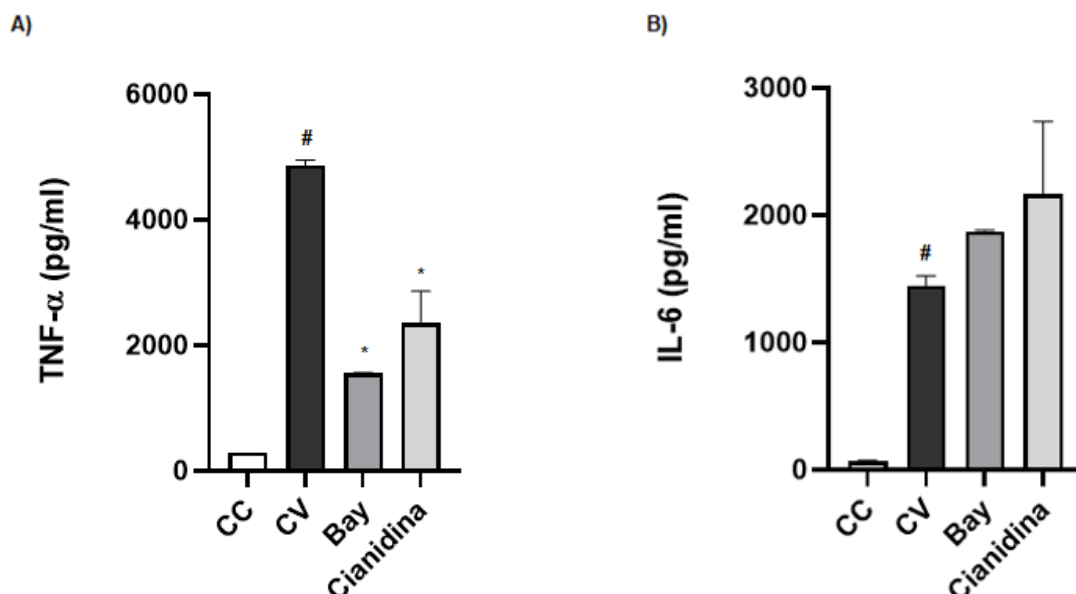


**Figura 4. Curva dosis-respuesta para la determinación de la actividad antiviral de la cianidina frente al CCoV en células CRFK.** Células CRFK fueron infectadas con CCoV (m.i.=0,1) y tratadas con distintas concentraciones de cianidina, luego de 24 h de incubación a 37 °C, se determinó el rendimiento viral mediante el ensayo de formación de placas. Se graficaron los porcentajes de inhibición del rendimiento viral en función de la concentración. Los resultados corresponden al promedio de 2 repeticiones ± DE.

#### 4. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de cianidina en macrófagos

Para evaluar si cianidina es capaz de modular la producción de citoquinas en células infectadas, se midió su efecto en macrófagos murinos infectados con CCoV. Para ello, las células J774A.1 fueron infectadas con CCoV (m.i.=0,1), y luego de la infección, se trataron o no con cianidina (25 µg/ml). Como control de la actividad inmunomoduladora, se trataron a las células infectadas con BAY 11-7085 (10 µg/ml). Al cabo de 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificaron las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  mediante ELISAs específicos.

Cuando las células J774A.1 fueron infectadas con CCoV, la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  fue significativamente mayor en relación con las células sin infectar (Figura 5). Por otro lado, si bien cianidina y BAY 11-7085 no afectaron la producción de IL-6 en células infectadas con CCoV, el incremento de TNF- $\alpha$  se redujo en las células infectadas cuando fueron tratadas con cianidina y BAY 11-7085 post-infección. Por lo tanto, estos resultados demuestran que tanto cianidina como BAY 11-7085 disminuyeron la producción de TNF- $\alpha$  en las células J774A.1 infectadas con CCoV, mientras que no afectaron la producción de IL-6 (Figura 5).



**Figura 5. Efecto de cianidina en la producción de TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) en células J774A.1 infectadas con CCoV.** Células J774A.1 fueron infectadas con CCoV (m.i. = 0,1) y tratadas con cianidina (25 µg/ml) o BAY 11-7085 (BAY; 10 µg/ml) durante 24 h. La concentración de TNF- $\alpha$  e IL-6

en los sobrenadantes fue determinada por ELISA. CC = Control de células; CV=Control de virus; # indica diferencias significativas respecto al control de células; \* indica diferencias significativas respecto al control de virus ( $p < 0,05$ ). Los resultados corresponden al promedio de 2 repeticiones  $\pm$  DE.



## Discusión

En la actualidad, a pesar del éxito de las vacunas contra COVID-19, continúa habiendo un porcentaje de vacunados que requieren hospitalización, fundamentalmente aquellos que presentan riesgo de COVID-19 severo. Por otra parte, debido a la alta tasa de error de la ARN polimerasa viral, el virus podría adquirir mutaciones que evadan la respuesta inmune y afecten la efectividad de estas vacunas. Por estas razones, resulta importante la búsqueda de antivirales como estrategia complementaria para tratar esta patología. Por otra parte, los CoV seguirán circulando entre hospedadores animales como hasta ahora, por lo que es de esperar la probable emergencia de nuevas poblaciones virales potencialmente pandémicas en un futuro no muy lejano. En este sentido, debemos producir prospectivamente terapias antivirales de amplio espectro frente a los HCoV. De esta forma, podremos disponer no sólo de nuevos antivirales para mitigar el COVID-19, sino también estar preparados frente a una potencial nueva pandemia.

Hoy en día, existen algunos antivirales aprobados como tratamiento para COVID-19. Estos antivirales son de acción directa, dado que su mecanismo de acción consiste en afectar blancos virales considerados esenciales para la multiplicación del virus. Una desventaja del uso de este tipo de antiviral es que, debido a la alta tasa de mutación de los virus, y en particular de los virus de ARN como los CoV, pueden dejar de ser efectivos ante la aparición de resistencia. En ese sentido, mutaciones en la proteasa causante de la resistencia a Paxlovid son cada vez más frecuentes. Por estas razones, una estrategia alternativa es la búsqueda de antivirales que actúen sobre factores del hospedador implicados en la replicación viral. Si este blanco celular también participa en el ciclo de multiplicación de otros virus, podría obtenerse un antiviral de amplio espectro de acción (pan-antiviral). En el caso de los HCoV, el desarrollo de un pan-CoV podría convertirse en la estrategia de tratamiento definitiva contra las infecciones causadas por los CoV circulantes y emergentes.

Por otra parte, durante las infecciones con HCoV ocurre una detección del virus por factores del hospedador y se desencadena una respuesta inmune. Una exacerbada respuesta inflamatoria de citoquinas y quemoquinas se correlacionan con

la alta morbilidad y mortalidad observada durante las infecciones causadas por HCoV patógenos. Por lo tanto, además de controlar la carga viral, la investigación de nuevas estrategias dirigidas a atenuar la respuesta inflamatoria probablemente mejore los resultados clínicos obtenidos de drogas antivirales.

Las plantas medicinales, han sido ampliamente utilizadas a través de los años para tratar varias enfermedades de tipo infecciosas o no infecciosas. Se han observado varios compuestos naturales que poseen efectos secundarios leves o nulos, alta especificidad biológica, alta diversidad química, y que actúan sobre múltiples sitios del huésped por diferentes vías con un mínimo costo (Choudhary & Pan, 2020). Cianidina, es un colorante natural de las plantas responsable de las pigmentaciones rojas, azules y moradas de sus productos. Se ha reportado que posee múltiples beneficios farmacológicos, entre ellos, es un potente antioxidante y quelante de metales, y tiene propiedades antiinflamatorias, antivirales y anticarcinogénicas (Thummayot S et al., 2018). En su mecanismo de acción, cianidina inhibe la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Pergola C et al., 2006). Por otra parte, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio revelan que cianidina presenta actividad virucida, antiviral e inmunomoduladora frente al RSV, *in vitro* e *in vivo* (Benedetti M et al., 2019; Benedetti M, 2020, Benedetti M et al., 2021).

Entonces, teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta de sumo interés el estudio de cianidina como potencial antiviral e inmunomodulador frente a los CoV.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que cianidina fue efectiva para reducir la multiplicación de SARS-CoV-2 y del CCoV, por lo que sugiere que exhibe una actividad antiviral de amplio espectro frente a los CoV. El índice de selectividad (IS) indica cuán prometedor es el compuesto como antiviral, y se obtuvo que su valor es mayor a 13,2 para la línea celular CFRK infectada con CCoV. Como se estima que un valor de IS bueno es mayor a 10, esto indicaría que cianidina sería prometedor como antiviral frente a los coronavirus.

Por otra parte, si bien previamente se detectó que cianidina era capaz de inactivar directamente las partículas virales de RSV a 37 °C (Benedetti M, 2020; Benedetti M et al., 2019, 2021; Benedetti M et al., 2021), no se observó dicho efecto frente al CCoV en las mismas condiciones. Probablemente las diferencias en la

estructura de las partículas virales del RSV y los CoV sean responsables de esas diferencias. En general, los blancos de acción de los agentes virucidas en virus envueltos son las envolturas y los ligandos proteicos o glicoproteicos de los receptores celulares (Maillard et al., 2012). Tanto RSV como los CoV poseen envoltura, sin embargo, se diferencian en cuanto a su estructura y a las proteínas/glicoproteínas que se hallan en su superficie. El RSV posee una envoltura esférica irregular con un tamaño de 150-300 nm (Mohapatra & Lockey, 2008). En cambio, las partículas de CoV tienen una estructura oval y un tamaño menor que el RSV, de 80-120 nm (Kirtipal et al., 2020; Kumar & Saxena, 2021).

Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la cianidina frente al CCoV podría deberse principalmente a un efecto sobre la replicación viral dentro de las células.

La disminución del porcentaje de células que expresan la glicoproteína viral S de SARS-CoV-2 en presencia de cianidina podría deberse a un efecto directo de cianidina sobre la síntesis de dicha glicoproteína. Sin embargo, está descrito que en el ciclo de replicación de SARS-CoV-2 la brotación de partículas virales se inicia a las 12 h p.i., y alcanza un pico a las 36 h p.i. (Kim et al., 2021). Dado que estos ensayos para evaluar el efecto de cianidina sobre la síntesis de macromoléculas virales fueron realizados con una m.i. de 0,1, no todas las células resultan infectadas en un primer ciclo de infección. Entonces, considerando que recién a las 24 h p.i. se obtuvieron diferencias significativas, podría haber ocurrido más de un ciclo de infección. En consecuencia, no podemos descartar que la reducción de la expresión de la glicoproteína S se deba a una inhibición de la propagación viral por cianidina, y no por un efecto directo sobre la síntesis de la glicoproteína S.

Por otra parte, en este trabajo hemos demostrado que cianidina reduce los niveles de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en macrófagos frente a la infección con CCoV y no así la de la IL-6, esto puede deberse a que tiene una vía de señalización alternativa. Por lo tanto, estos resultados están en concordancia con trabajos previos donde se caracteriza a cianidina como una molécula con capacidad antiinflamatoria (Mittal M et al., 2014; Pergola C et al., 2006). Además, en experimentos previos en el laboratorio se observó que cianidina inhibe la producción de citoquinas frente a estimulación con ligandos de TLR, en ausencia de infección (Benedetti M., 2020). Debido a que se observó que CCoV no multiplica en la línea celular J774A.1, se puede

inferir que cianidina redujo la producción de esta citoquina independientemente su actividad antiviral, por lo que actuaría como antiviral e inmunomodulador de manera independiente.

Por lo tanto, cianidina presentaría un efecto directo sobre la síntesis de citoquinas, probablemente como consecuencia de afectar uno o más blancos celulares que estén involucrados en la producción de citoquinas. Cuando los coronavirus infectan una célula hospedadora el ARN doble cadena, producto de la replicación y transcripción del genoma, es reconocido por PRRs celulares, y esto desencadena vías de señalización, como la MYD88, e induce la estimulación de NF- $\kappa$ B. Cuando el NF- $\kappa$ B está activo, induce la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias. En este sentido, dado que tanto cianidina como BAY 11-7085 disminuyen la producción de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  en las células J774A.1 infectadas con CCoV, y se ha reportado que cianidina inhibe la activación de NF- $\kappa$ B frente a distintos estímulos, dicha disminución podría deberse a una reducción de la activación de NF- $\kappa$ B.

En conclusión, en este trabajo se ha demostrado que cianidina posee una actividad antiviral de amplio espectro frente a los CoV, dado que inhibe la multiplicación del CCoV y de SARS-CoV-2. Por otra parte, también posee una actividad inmunomoduladora en células J774A.1 infectadas con CCoV independiente de su actividad antiviral, disminuyendo la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Sin embargo, como efecto adverso podría incrementar el riesgo de infección con otros patógenos, en particular, en pacientes inmunosuprimidos (Bascones-Martinez et al., 2014). A pesar de esto, como esta infección viral es un proceso agudo de rápida resolución, el tiempo de tratamiento es corto, por lo tanto el riesgo asociado al tratamiento sería menor que en el caso de una enfermedad crónica y habría más beneficios que efectos adversos.

Por lo tanto, cianidina presenta actividad antiviral e inmunomoduladora en células infectadas con los CoV *in vitro*. Los resultados obtenidos en este trabajo incentivan a avanzar y ahondar en la comprensión de los mecanismos de acción antiviral de la cianidina, tanto *in vitro* como *in vivo*.

## Bibliografía

- Akinosoglou, K., Schinas, G., & Gogos, C. (2022). Oral Antiviral Treatment for COVID-19: A Comprehensive Review on Nirmatrelvir/Ritonavir. *Viruses* 2022, Vol. 14, Page 2540, 14(11), 2540. <https://doi.org/10.3390/V14112540>
- Bascones-Martinez, A., Mattila, R., Gomez-Font, R., & Meurman, J. H. (2014). Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 19(1), e24. <https://doi.org/10.4317/MEDORAL.19087>
- Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., Hohmann, E., Chu, H. Y., Luetkemeyer, A., Kline, S., Lopez de Castilla, D., Finberg, R. W., Dierberg, K., Tapson, V., Hsieh, L., Patterson, T. F., Paredes, R., Sweeney, D. A., Short, W. R., ... Lane, H. C. (2020). Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *The New England Journal of Medicine*, 383(19), 1813–1826. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2007764>
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/V4061011>
- Benedetti M. (2020). *Un flavonoide natural con actividad dual, antiviral y antiinflamatoria, frente al virus sincicial respiratorio, agente causal de la bronquiolitis epidémica [Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires]*. .
- Benedetti, M. et al. (2019). Un flavonoide natural con actividad dual, antiviral y antiinflamatoria, frente al virus sincicial respiratorio. *XXXIX Reunión Científica Anual de La SAV 2019*.
- Benedetti M. et al. (2021). El flavonoide cianidina presenta actividad antiviral e inmunomoduladora frente al virus respiratorio sincicial in vitro e in vivo. *XIII Congreso Argentino de Virología (CAV)* .
- Benedetti, M. et al. (2021). The flavonoid cyanidin shows antiviral and immunomodulatory properties against RSV, in vitro and in vivo. *34th International Conference on Antiviral Research (ICAR)* .
- Choudhary, D., & Pan, M. H. (2020). Antiviral effects of anthocyanins and phytochemicals as natural dietary compounds on different virus sources. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 8(3), 674–681. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.8.3.01>
- COVID-19 Treatment Guidelines Panel. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*. National Institutes of Health. (2023). <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)

- Focosi, D., McConnell, S., Shoham, S., Casadevall, A., Maggi, F., & Antonelli, G. (2023). Nirmatrelvir and COVID-19: development, pharmacokinetics, clinical efficacy, resistance, relapse, and pharmacoconomics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *61*(2), 106708. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2022.106708>
- Hariharan, A., Hakeem, A. R., Radhakrishnan, S., Reddy, M. S., & Rela, M. (2021). The Role and Therapeutic Potential of NF-kappa-B Pathway in Severe COVID-19 Patients. *Inflammopharmacology*, *29*(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/S10787-020-00773-9>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* *2020* *19*:3, *19*(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hulswit, R. J. G., Lang, Y., Bakkers, M. J. G., Li, W., Li, Z., Schouten, A., Ophorst, B., Van Kuppeveld, F. J. M., Boons, G. J., Bosch, B. J., Huizinga, E. G., & De Groot, R. J. (2019). Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(7), 2681–2690. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1809667116/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Khan, S., Shafiei, M. S., Longoria, C., Schoggins, J. W., Savani, R. C., & Zaki, H. (2021). SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-κB pathway. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.68563>
- Kim, D., Kim, S., Park, J., Chang, H. R., Chang, J., Ahn, J., Park, H., Park, J., Son, N., Kang, G., Kim, J., Kim, K., Park, M. S., Kim, Y. K., & Baek, D. (2021). A high-resolution temporal atlas of the SARS-CoV-2 translome and transcriptome. *Nature Communications* *2021* *12*:1, *12*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25361-5>
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, *85*, 104502. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104502>
- Kumar, S., & Saxena, S. K. (2021). Structural and molecular perspectives of SARS-CoV-2. *Methods*, *195*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2021.03.007>
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(6). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001651>
- Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, *3*(1), 237–261. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-110615-042301>
- Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Pan, P., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, *92*(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/JMV.25685>
- Li, M., Wang, H., Tian, L., Pang, Z., Yang, Q., Huang, T., Fan, J., Song, L., Tong, Y., & Fan, H. (2022). COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects.

*Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), 1–32.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>

Liu, D. X., Liang, J. Q., & Fung, T. S. (2021). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of Virology*, 428. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>

Lopardo, G. D. (2020). *Remdesivir: su papel en el tratamiento de la COVID-19*. *Revista Argentina de Salud Pública*.  
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1853-810X2020000300018](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1853-810X2020000300018)

Maillard, J. Y., Sattar, S. A., & Pinto, F. (2012). Virucidal Activity of Microbicides. *Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 178–207. <https://doi.org/10.1002/9781118425831.CH9>

Malik, Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian J Pathol*, 42(1), 3–11.

Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5149>

Mohapatra, S. S., & Lockey, R. F. (2008). Respiratory Syncytial Virus Infection: From Biology to Therapy A Perspective. *The World Allergy Organization Journal*, 1(2), 21. <https://doi.org/10.1097/WOX.0B013E31816549A2>

Moradian, N., Gouravani, M., Salehi, M. A., Heidari, A., Shafeghat, M., Hamblin, M. R., & Rezaei, N. (2020). Cytokine release syndrome: inhibition of pro-inflammatory cytokines as a solution for reducing COVID-19 mortality. *European Cytokine Network*, 31(3), 81–93. <https://doi.org/10.1684/ECN.2020.0451>

Mukhtar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, R. J., Wigdahl, B., & Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, 131(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2007.09.008>

*Organización Mundial de la Salud*. (n.d.). Retrieved January 24, 2023, from <https://www.who.int/es>

Owen, D. R., Allerton, C. M. N., Anderson, A. S., Aschenbrenner, L., Avery, M., Berritt, S., Boras, B., Cardin, R. D., Carlo, A., Coffman, K. J., Dantonio, A., Di, L., Eng, H., Ferre, R. A., Gajiwala, K. S., Gibson, S. A., Greasley, S. E., Hurst, B. L., Kadar, E. P., ... Zhu, Y. (2021). An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*, 374(6575), 1586–1593. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABL4784/SUPPL\\_FILE/SCIENCE.ABL4784\\_MДАР\\_REPRODUCIBILITY\\_CHECKLIST.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABL4784/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABL4784_MДАР_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF)

Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., & Sautebin, L. (2006). Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 15(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2005.10.003>

- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 797–807. <https://doi.org/10.2174/0929867013373011>
- Rojas, J. J. H., Tellería, W. M. Y., Quintana, A. D. B., Manyari, L. C. R., Puertas, S. J. G., Gamboa, J. L. V., Ventura, J. A. A., & López, M. V. (2021). Alimentos con potencial efecto inmunomodulador y antiviral a propósito de la pandemia COVID-19. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 23(2), 199–220. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v23n2a06>
- Scialo, F., Daniele, A., Amato, F., Pastore, L., Matera, M. G., Cazzola, M., Castaldo, G., & Bianco, A. (2020). ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung*, 198(6), 867–877. <https://doi.org/10.1007/S00408-020-00408-4>
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), 11727–11734. [https://doi.org/10.1073/PNAS.2003138117/SUPPL\\_FILE/PNAS.2003138117.SD01.XLSX](https://doi.org/10.1073/PNAS.2003138117/SUPPL_FILE/PNAS.2003138117.SD01.XLSX)
- Simonis, A., Theobald, S. J., Fätkenheuer, G., Rybniker, J., & Malin, J. J. (2021). A comparative analysis of remdesivir and other repurposed antivirals against SARS-CoV-2. *EMBO Molecular Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.15252/EMMM.202013105>
- Thummayot, S., Tocharus, C., Jumnongprakhon, P., Suksamrarn, A., & Tocharus, J. (2018). Cyanidin attenuates A $\beta$ 25-35-induced neuroinflammation by suppressing NF- $\kappa$ B activity downstream of TLR4/NOX4 in human neuroblastoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(9), 1439. <https://doi.org/10.1038/APS.2017.203>
- Turner, A. J. (2013). Aminopeptidase N. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 1, 397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00079-X>
- Wang, L., Chen, M., Lam, P. Y., Dini-Andreote, F., Dai, L., & Wei, Z. (2022). Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-022-01420-X>