

Imiquimod inhibe la multiplicación de los coronavirus en etapas tardías del ciclo viral a través de la vía MAPK/ERK

Vicente, J(1,2); Peñaranda Figueredo, FA(1,2); Nemirovsky, SI(2); Barquero, AA(1,2); Shayo, CC(3); Bueno, CA(1,2).

(1) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Virología, Buenos Aires, Argentina; (2) CONICET - Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Buenos Aires, Argentina; (3) Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: josefina.vicente@outlook.com

Introducción: Imiquimod (IMQ) es un agonista del receptor tipo *Toll* 7 (TLR7), que posee actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* contra el virus sincicial respiratorio, e *in vitro* contra el coronavirus canino (CCoV) y SARS-CoV-2, de manera independiente de la vía de señalización TLR7/NF- κ B. Dado que IMQ activa la vía de ERK1/2 y AP-1, y un inhibidor específico de las quinasas MEK1/2 (UO126) reduce la actividad antiviral del IMQ frente a los coronavirus, entonces hipotetizamos que IMQ exhibiría su actividad antiviral frente a los coronavirus a través de la activación de la vía de señalización de MAPK/ERK. Objetivo: Profundizar en el estudio del mecanismo de acción antiviral del IMQ frente a los coronavirus. Metodología: Evaluamos la citotoxicidad del compuesto en células CRFK (células epiteliales de riñón de gato) y Calu-3 (células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humanas) por MTT, y la actividad antiviral por ensayos de inhibición del rendimiento viral. Para investigar los cambios en la expresión génica inducidos por IMQ, realizamos un análisis transcriptómico. Además, evaluamos la fosforilación de ERK1/2 por Western Blot. Resultados: En primer lugar, observamos que IMQ no presentó actividad virucida frente a CCoV y SARS-CoV-2. Además, los ensayos de pretratamiento, adsorción e internalización mostraron que IMQ inhibió la replicación del CCoV únicamente cuando se administró post-infección (p.i.). Por otro lado, los ensayos de tiempo de adición y remoción en diferentes intervalos p.i. demostraron que IMQ fue capaz de inhibir la formación de partículas infecciosas aun cuando se añadió hasta 10 h p.i. Asimismo, al removerlo a partir de las 6 h p.i. en adelante, continuó inhibiendo significativamente la replicación viral. Por otro lado, el análisis transcriptómico tanto de células que expresan TLR7 como en células deficientes de TLR7, reveló que la estimulación con IMQ induce la transcripción de proteínas asociadas a la vía de señalización MAPK en ambos tipos celulares. Al evaluar la fosforilación de ERK1/2, observamos que los cultivos infectados con CCoV y tratados con IMQ presentaron una fosforilación temprana de ERK1/2 a los 10 min, seguida de una segunda ola de fosforilación a las 6 h p.i., similar a lo observado en las células no infectadas y tratadas con IMQ. Mientras que en células infectadas sin tratar, observamos que la fosforilación de ERK1/2

se indujo únicamente en las primeras etapas de la infección, hasta el final de la adsorción, y luego se mantuvo en niveles comparables a los de las células no infectadas. Conclusiones: IMQ inhibe la propagación de los coronavirus cuando se agrega p.i. afectando principalmente las etapas tardías del ciclo viral. IMQ induce la activación de la vía de señalización ERK/MAPK con un patrón bifásico, siendo la segunda fase de activación de ERK a tiempos tardíos p.i. la que afectaría la replicación viral de los coronavirus.