



XUNTA
DE GALICIA



UNIÓN EUROPEA



Xacobeo 2021



galicia

Axudas para rescate de proxectos galegos ISCIII - Fondo COVID-19

Potenciar a investigación, o desenvolvemento tecnolóxico e a innovación

Operación cofinanciada pola Unión Europea, a través do FONDO EUROPEO DE DESENVOLVEMENTO REXIONAL (FEDER)

PROGRAMA OPERATIVO

FEDER GALICIA

2014-2020

Unha maneira de facer Europa

Expediente	IN845D 2020/11
Título	Spikesomas para la degradación del SARS-CoV-2 basada en CRISPR/Cas13d
Investigador principal	Manuel Collado Rodríguez

Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, IDIS
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, CHUS
Travesía da Choupana s/n, Edificio C, Planta -2, Laboratorio 13
Santiago de Compostela 15705
manuel.collado.rodriguez@sergas.es

ANTECEDENTES

Las herramientas basadas en CRISPR para la edición del genoma han experimentado una enorme expansión en los últimos años con nuevas aplicaciones que se presentan constantemente. En esta propuesta quisimos explorar la posibilidad de dirigir una nucleasa específica de ARN, Cas13d, para degradar el genoma del SARS-CoV-2 utilizando gRNA específicos. Con este objetivo, nos planteamos encapsular un complejo RNP de Cas13d y gRNAs en liposomas que expresen la proteína Spike viral en su superficie, Spikesomes, para proporcionar un direccionamiento específico a las células infectables.

Nos propusimos evaluar la especificidad de los Spikesomes y la eficiencia de la degradación dirigida del genoma del SARS-CoV-2.

OBJETIVOS

Como objetivos de este proyecto tuvimos:

Objetivo 1. Generación y análisis de liposomas con proteína Spike de SARS-CoV-2 en su superficie, Spikesomes

Objetivo 2. Análisis del targeting específico de ACE2 por Spikesomes

RESULTADOS

Hemos conseguido generar nanopartículas a partir de membranas celulares con proteína Spike o no en su composición, y que incluían complejos de Cas13d y gRNAs específicos. Estas nanopartículas demostraron tener capacidad para internarse en las células diana y liberar allí su carga. La nucleasa Cas13d dirigida así a células es funcional y capaz de reducir de manera específica la expresión de genes diana.

Los experimentos con coronavirus requieren de instalaciones de bioseguridad BSL-3 y hemos establecido una colaboración con grupos expertos localizados en el CNB de Madrid en donde cuentan con las instalaciones y sistemas adecuados para estos análisis.

Expediente	IN845D 2020/19
Título	Pharmaceutical development of Fast-Track and innovative therapies targeting ACE2 for COVID-19
Investigador principal	Mabel Loza García

OBJETIVOS

Objetivo 1. Búsqueda de nuevas entidades químicas que modulen dianas específicas del virus SARS CoV-2.

Objetivo 2. Reposicionamiento de un fármaco, previamente aprobado para otra patología, que sea útil en el tratamiento de la infección COVID-19 con la finalidad de realizar la evaluación preclínica y hacer una prueba de concepto clínica en humanos.

RESULTADOS

1) Se **identificaron nuevas entidades químicas** con actividad sobre 4 dianas víricas (TMPRSS2, ACE2 y dos proteasas virales, MPro y PPro), con posible actividad frente a la infección por SARS-CoV-2 y otros coronavirus.

2) Se **evaluó el compuesto de reposicionamiento, E-52862** (aprobado en Fase II de evaluación clínica por la FDA para el tratamiento del dolor neuropático), para el tratamiento del SARS-CoV-2 y se **realizó un ensayo clínico** con este compuesto como prueba de concepto en 30 pacientes reclutados entre el Centro de Salud de A Estrada, el Servicio de Urgencias del Hospital Clínico Universitario de Santiago y el Servicio de Urgencias del Hospital de Barbanza, en colaboración con el Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas de Barcelona.

CONCLUSIONES

Este proyecto ha contribuido a mejorar el conocimiento terapéutico de la enfermedad COVID-19, y de virus de ARN en general, al desarrollar a corto plazo terapias fast-track e innovadoras basadas en compuestos que bloquean la entrada del virus SARS-CoV-2 en las células humanas. Ha dado una rápida respuesta terapéutica a la emergencia sanitaria por COVID-19 mediante dos estrategias:

1) El desarrollo de nuevas entidades químicas o leads para 4 mecanismos terapéuticos distintos en COVID-19 y en virus de ARN en general, mediante un modelo in vitro validado de aceleración de programas de descubrimiento de fármacos, para llegar a los pacientes de una manera coste-eficiente.

2) La prueba de concepto en humanos del compuesto E-52862 (fast-track), en el que todos los recursos necesarios para la evaluación preclínica (compuestos candidatos a reposicionamiento, cribado in silico, plataforma de cribado, ensayos biológicos e información de farmacocinética y seguridad) se han desarrollado de manera satisfactoria, permitiendo el paso rápido a la fase de **ensayo clínico de un nuevo posible fármaco oral, primero desarrollado en España, para el tratamiento etiológico (causal) del COVID-19.**

Con ello se ha cerrado el círculo del ecosistema emergente en Galicia de descubrimiento de fármacos al llegar a la fase de ensayos clínicos, donde a pesar de que los hospitales gallegos tienen capacidades para realizar pruebas de concepto y ensayos clínicos Fase I en pacientes, existe un déficit en de este tipo de estudios. Con este proyecto se ha potenciado y se ha consolidado la cadena de valor, promoviendo la colaboración entre la investigación básica y clínica, imprescindible para tener un efecto sobre los pacientes y la sociedad en general.

Expediente	IN845D 2020/20
Título	Clarificación del efecto beneficioso o perjudicial de los tratamientos con sartanes, IECAS e ibuprofeno
Investigador principal	José Luis Rodríguez Labandeira e Ana Isabel Rodríguez Pérez

Objetivo 1. Establecer las bases para el desarrollo de un biomarcador de progresión de Covid-19 basado en la detección sérica de niveles de autoanticuerpos del SRA (Inicialmente AA-AT1 y AA-ACE2)

Se había sugerido que enfermedades relacionadas con inflamación periférica se encontraban asociadas a la presencia de autoanticuerpos frente al SRA, particularmente autoanticuerpos agonistas para receptores de angiotensina tipo 1 (AA-AT1) y autoanticuerpos contra ACE2 (AA-ACE2). Sin embargo, la presencia de estos autoanticuerpos y su posible correlación con la gravedad de esta enfermedad no había sido estudiada. Para abordar esta cuestión, se planteó la primera parte de este proyecto, en la que se estudiaron los niveles séricos de autoanticuerpos AA-AT1 y AA-ACE2 en individuos control y en pacientes con COVID-19. La gravedad de la enfermedad de los pacientes con COVID-19 se definió como leve, moderada o grave según la escala de progresión clínica de la OMS y se determinó en el momento del alta médica. Se midieron AA-AT1 y AA-ACE2 en suero en pacientes con COVID-19 (n = 119) y controles no infectados (n = 23) utilizando ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas tipo sándwich de fase sólida específicos. Los niveles séricos de LIGHT (TNFSF14; miembro 14 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral; factor implicado en la síntesis de los AA-AT1) se midieron con el kit de ensayo correspondiente. En el momento del diagnóstico, los niveles de AA-AT1 y AA-ACE2 fueron significativamente más altos en el grupo de COVID-19 en relación con los controles, y observamos una asociación significativa entre la progresión de la enfermedad y los niveles séricos de AA-AT1 y AA-ACE2. Los pacientes con enfermedad leve tenían niveles significativamente más bajos de AA-AT1 ($p < 0,01$) y AA-ACE2 ($p < 0,001$) que los pacientes moderados y graves. No se detectaron diferencias significativas entre hombres y mujeres ni se relacionó con comorbilidades que pudieran afectar la gravedad de la COVID-19. Hubo una correlación positiva significativa entre los niveles séricos de AA-AT1 y LIGHT (TNFSF14; $r_{\text{Pearson}} = 0,70$, $p < 0,001$). Nuestros resultados sugieren que, tanto AA-AT1 (mediante la estimulación agonística de los receptores AT1) como AA-ACE2 (al reducir la conversión de angiotensina II en angiotensina 1-7) pueden aumentar la actividad del receptor AT1 e incrementar las respuestas proinflamatorias, promoviendo la gravedad de la COVID-19. Los resultados obtenidos muestran que aquellos pacientes con niveles altos de autoanticuerpos requieren un control más cauteloso después del diagnóstico. Además, alientan a realizar más estudios sobre el posible tratamiento protector con bloqueadores de los receptores AT1 (sartanes) en la COVID-19.

En la etapa siguiente del trabajo nos propusimos averiguar si existían correlaciones entre estos autoanticuerpos y parámetros bioquímicos empleados en la práctica clínica de rutina que permitiesen una clasificación inicial de los pacientes. Para ello, sobre la cohorte inicial de 119 pacientes con COVID-19 se seleccionaron 50 pacientes que reunían un conjunto completo de parámetros bioquímicos, datos clínicos e información sobre la progresión de la enfermedad. Se utilizó un algoritmo Random Forest para seleccionar indicadores de pronóstico y el coeficiente de Spearman para analizar las correlaciones con AT1-AA, ACE2-AA. Nuestros resultados indican que la disminución de una unidad de hemoglobina, el aumento de 0,25 unidades de procalcitonina o el aumento de 100 unidades de lactato deshidrogenasa aumentan la gravedad de la enfermedad en un 35,27, 69,25 y 3,2%, respectivamente. El modelo de regresión logística binaria construido tuvo una capacidad predictiva para diferenciar entre enfermedad leve y moderada/grave del 84 %, y entre enfermedad leve/moderada y grave del 76 %. Además, los parámetros seleccionados mostraron fuertes correlaciones con AT1-AA o ACE2-AA, particularmente en hombres. Los resultados obtenidos muestran que la hemoglobina, la lactato deshidrogenasa y la

procalcitonina se pueden utilizar para la clasificación inicial de pacientes con COVID-19 el día de la admisión. La determinación posterior de biomarcadores más complejos puede proporcionar más datos sobre la gravedad, los mecanismos y las opciones terapéuticas.

Los resultados detallados derivados de la consecución del objetivo 1 pueden consultarse en:

Rodriguez-Perez, A.I., Labandeira, C.M., Pedrosa, M.A., Valenzuela, R., Suarez-Quintanilla, J.A., Cortes-Ayaso, M., Mayan-Conesa, P., Labandeira-Garcia, J.L., 2021. Autoantibodies against ACE2 and angiotensin type-1 receptors increase severity of COVID-19. *J Autoimmun.* 122, 102683. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102683>. Índice de Impacto (IF) (2021): 14,511.

Labandeira, C.M., Pedrosa, M.A., Suarez-Quintanilla, J.A., Cortes-Ayaso, M., Labandeira-Garcia, J.L., Rodriguez-Perez, A.I., 2022. Angiotensin System Autoantibodies Correlate With Routine Prognostic Indicators for COVID-19 Severity. *Front Med (Lausanne).* 9, 840662. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.840662>. IF (2021): 5,058.

Objetivo 2. Averiguar si se deben interrumpir, continuar o potenciar el uso de sartanes (ARAI), IECAs y antiinflamatorios como ibuprofeno y similares ante el riesgo/presencia de infección por coronavirus.

El enzima ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) es un elemento clave del Sistema Renina Angiotensina (SRA) que aumenta la respuesta antiinflamatoria tisular e inmediatamente, desde el inicio de la pandemia por COVID-19 fue identificado como el receptor funcional de entrada para el virus SARS-CoV-2, convirtiéndose así en el elemento clave que relacionaba el SRA y COVID-19.

Este doble papel de ACE2 generó en el momento inicial de la pandemia un debate sobre el uso, perjudicial o beneficioso, de tratamientos que modulaban el SRA y la expresión de sus receptores. Nos referimos a fármacos antihipertensivos (tipo sartanes y IECAS) y a fármacos antiinflamatorios (tipo ibuprofeno) utilizados por millones de personas en el mundo pero, y sobre todo, por pacientes que presentaban mayor vulnerabilidad a la gravedad por COVID-19: pacientes envejecidos y/o con síndrome metabólico, usuarios más frecuentes de este tipo de fármacos. ¿Era beneficioso o perjudicial seguir manteniendo los tratamientos y así fomentar la respuesta antiinflamatoria a nivel pulmonar o, con ello, se favorecería una mayor entrada del virus?

Para dar respuesta a esta cuestión se planteó la segunda parte de este proyecto, administrando estos tratamientos a modelos animales de ratas jóvenes, ratas envejecidas y ratas con Síndrome Metabólico. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con sartanes, IECAS e ibuprofeno aumentaba la expresión de los receptores del eje anti-inflamatorio del SRA (ACE2 incluido) a nivel pulmonar, efecto particularmente pronunciado en los modelos que cursan con inflamación periférica crónica (envejecimiento y síndrome metabólico). Este incremento se confirmó a nivel celular en cultivos de neumocitos humanos de tipo II. Se comprobó, además, que la posible regulación positiva de la entrada viral a través del aumento de expresión de ACE2 transmembrana inducido por tratamientos moduladores del SRA era contrarrestada por mecanismos adicionales de los tratamientos mencionados, particularmente por la inhibición de la actividad de proteasas implicadas en la entrada celular de SARS-CoV-2 (ADAM17 y TMPRSS2). En resumen, estos medicamentos disminuyen la respuesta inflamatoria sin aumentar o incluso disminuyendo la internalización del virus en las células.

Los resultados detallados enmarcados dentro del objetivo 2 pueden consultarse en:

Pedrosa, M.A., Valenzuela, R., Garrido-Gil, P., Labandeira, C.M., Navarro, G., Franco, R., Labandeira-Garcia, J.L., Rodriguez-Perez, A.I., 2021. Experimental data using candesartan and captopril indicate no double-edged sword effect in COVID-19. *Clin Sci (Lond).* 135 (3), 465-481. <https://doi.org/10.1042/CS20201511>. IF (2021): 6,876.

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. *Clin Transl Med.* 11 (4), e371. <https://doi.org/10.1002/ctm2.371>. IF (2021): 8,554.

Finalmente, para la conclusión del proyecto se realizó una revisión bibliográfica a cerca de los fármacos moduladores del sistema renina-angiotensina en el tratamiento de la COVID-19, que puede consultarse en:

Labandeira-Garcia, J.L., Labandeira, C.M., Valenzuela, R., Pedrosa, M.A., Quijano, A., Rodriguez-Perez, A.I., 2022. Drugs Modulating Renin-Angiotensin System in COVID-19 Treatment. *Biomedicines.* 10 (2), <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020502>. IF (2021): 4,757.

Expediente	IN845D 2020/23
Título	Evaluación de la influencia de los factores genéticos del huésped en la susceptibilidad, patogenia, diagnóstico y pronóstico en la infección por SARS-COV-2 (GEN-COVID)
Investigador principal	Federico Martín Torres

OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

1. Identificar marcadores genéticos que predigan la susceptibilidad y el pronóstico de la infección por SARS-COV-2, posibilitando medidas terapéuticas o preventivas personalizadas.
2. Identificar firmas transcriptómicas locales y sistémicas que permitan el diagnóstico preciso de Infección por SARS-COV-2 en diferentes etapas de su historia natural y su diferencial preciso con otras infecciones por coronavirus.
3. Identificar biomarcadores solubles relacionados con la inmunidad que permitan caracterizar la respuesta inmune a SARS-COV-2.

RESULTADOS:

En el proyecto GEN-COVID hemos planteado dos abordajes moleculares principales para estudiar la enfermedad producida por el SARS-CoV-2, enfocándonos preferentemente en el contexto de la respuesta diferencial de los pacientes a la infección. A través del estudio genómico y transcriptómico de muestras procedentes de pacientes de COVID-19 con diferentes gravedades, así como de individuos sanos, hemos encontrado marcadores moleculares diagnóstico/pronóstico y de susceptibilidad que podrían ser de gran ayuda en la prevención y el pronóstico de la enfermedad. Además, hemos arrojado luz sobre los mecanismos moleculares y de respuesta inmune que subyacen a la COVID-19 y que podrían emplearse como dianas terapéuticas en el tratamiento de los pacientes más graves.

1. Abordaje genómico

En la parte genómica hemos llevado a cabo, por un lado, un estudio de exoma completo con el fin de buscar variantes raras del huésped que pudiesen estar relacionadas con la susceptibilidad y patogénesis de la enfermedad, y por otro lado una secuenciación del repertorio genómico de secuencias de receptores de células T (TCR) mediante inmuno-secuenciación para estudiar la respuesta inmune adaptativa generada frente al SARS-COV-2.

- **Secuenciación de exoma completo (WES)**: Aunque previamente se han descrito muchas variantes genéticas que se encuentran comúnmente en las poblaciones y que contribuyen a una COVID-19 más grave, las variantes más raras también podrían desempeñar un papel importante. El estudio de las variantes raras puede proporcionar información adicional sobre la susceptibilidad de la enfermedad y la patogénesis. La cohorte de pacientes GENCOVID (169 pacientes y 724 controles) se ha incluido en un macro-estudio en colaboración con varios grupos internacionales compuesto por 21 cohortes de pacientes de 12 países diferentes (28.159 individuos infectados por SARS-CoV-2, y hasta 597.165 controles), en un estudio combinado de exoma y genoma completo. Nuestro grupo ha participado activamente en el análisis de los datos. En un análisis comparativo de 5.085 casos de enfermedad grave y 571.737 controles, descubrimos que ser portador de una variante deletérea rara en el gen TLR7 (en el cromosoma X) está asociada con una probabilidad 5,3 mayor de padecer enfermedad grave. Es importante destacar que, a pesar de encontrarse en un cromosoma sexual, este hallazgo fue consistente en ambos sexos. Nuestros resultados apuntan a TLR7 como un determinante genético en

la enfermedad grave. Nuestro estudio es el primer meta-análisis enfocado al análisis de variantes genéticas raras que se ha realizado a escala mundial. El estudio acaba de ser aceptado para su publicación en la revista Q1 PLOS Genetics (se puede consultar el pre-print en la siguiente dirección: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.03.28.22273040v3>).

- **Inmuno-secuenciación (Immuno-SEQ)**: Estudio de la respuesta inmune adaptativa al SARS-COV-2 mediante la inmuno-secuenciación del repertorio genómico de secuencias de TCR es una herramienta que puede utilizarse como un indicador de las respuestas inmunitarias de las células T de un individuo frente a infecciones. El repertorio de TCR nos permite medir la expansión clonal y especificidad de las células T en respuesta a un antígeno, así como su dinámica longitudinal y heterogeneidad. Con el fin de estudiar la respuesta de las células T frente a la infección mediante coronavirus SARs-CoV-2, analizamos el repertorio de TCRs en 120 muestras de controles sanos, 98 muestras de pacientes en fase aguda de COVID-19 y 41 muestras procedentes de pacientes en fase convaleciente. Nuestros resultados muestran una reducción significativa en el número de células T con la severidad de la enfermedad. Como consecuencia, el número de secuencias TCR diferentes, así como la expansión clonal de las células T se vio significativamente reducida en pacientes de COVID-19 con gravedad moderada y grave en comparación con controles sanos, pacientes convalecientes y pacientes con enfermedad leve. En los individuos convalecientes y pacientes con enfermedad leve, sin embargo, se observó mayoritariamente una expansión de clones de células T cuyo TCR tenía reactividad frente a la proteína Spike (S) de la superficie del virus SARs-CoV-2 y frente a proteínas no-estructurales implicadas en la maquinaria de reproducción vírica. Actualmente nuestros análisis siguen enfocados en la identificación de firmas inmuno-genómicas específicas que nos permitan establecer correlatos de protección frente a nuevas variantes víricas y sustente una prevención personalizada. Estos resultados están pendientes de ser enviados a una revista para su publicación en cuanto se finalice el análisis de los datos obtenidos.

2. Abordaje transcriptómico

En lo que respecta a los análisis transcriptómicos, en primer lugar, hemos analizado la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune en pacientes de COVID-19 con diferentes gravedades (además de individuos sanos) en distintos tejidos, para estudiar la respuesta inmune del paciente en sangre, epitelio nasal y epitelio bucal. Así, hemos visto que los casos leves y asintomáticos mostraron una fuerte respuesta antiviral innata en el epitelio nasal, caracterizada por la activación de la vía del interferón (IFN), controlando con éxito la infección a nivel local. Por el contrario, los casos graves mostraron una respuesta antiviral innata más débil encabezada por macrófagos / monocitos y una ausencia de señal de IFN. En consecuencia, en la mucosa oral de pacientes graves encontramos señales de actividad y diseminación del virus hacia tracto respiratorio inferior, lo que en última instancia podría explicar la respuesta inmune innata exacerbada y la respuesta inmune adaptativa defectuosa observada a nivel sistémico en pacientes con este fenotipo. Los resultados de expresión en la mucosa oral sugieren que la cavidad bucal podría desempeñar un papel clave en la infección y diseminación del SARS-CoV-2 en pacientes con peor pronóstico. Por lo tanto, a través de nuestro estudio hemos sido capaces de encontrar genes relacionados con la gravedad, principalmente representados por genes implicados en el sistema inmune innato y las vías de señalización de citocinas. Nuestro estudio apunta a que la respuesta inmune local podría ser clave, y parece determinar el curso de la respuesta sistémica y, por lo tanto, la gravedad de la COVID-19. Nuestros hallazgos proporcionan una base para la investigación de los biomarcadores del huésped relacionados con la gravedad de la enfermedad, así como de las rutas moleculares que podrían ser relevantes para el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento de la COVID-19. Este trabajo de ha dado lugar a una publicación en la revista D1 Environmental Research (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35202626/>)

Otro de los estudios que hemos llevado a cabo, en este caso enfocado en el análisis detallado la respuesta diferencial a nivel sistémico de pacientes de COVID-19, secuenciamos el transcriptoma completo en muestras de sangre (RNA-seq) de 65 pacientes de COVID-19 con diferentes gravedades. A través de un análisis de expresión diferencial y un análisis de enriquecimiento de rutas estudiamos

cómo el transcriptoma difiere entre los individuos con COVID-19 leve, moderado y grave. Los análisis de gravedad revelaron una importante regulación al alza de los genes y las rutas relacionadas con la respuesta inmunitaria inflamatoria con el aumento de la gravedad, con un notable incremento de expresión en los genes y las vías relacionadas con la inmunidad mediada por neutrófilos, macrófagos e inmunoglobulinas, acompañados de una regulación a la baja en las vías relacionadas con la inmunidad mediada por células T. Esto sugiere que el aumento de la gravedad de la COVID-19 puede estar mediado en parte por la activación de los neutrófilos, que puede estar relacionada con la producción de inmunoglobulina a medida que se desarrolla la inmunidad adquirida. En este estudio, por primera vez, se ha mostrado cómo los tratamientos inmuno-moduladores administrados habitualmente a los pacientes con COVID-19 alteran en gran medida el transcriptoma de los pacientes. Este estudio se ha llevado a cabo en colaboración con un grupo de investigación internacional de enfermedades infecciosas del Imperial College de Londres que ha sido recientemente publicado en la revista Q1 Scientific Reports (<https://www.nature.com/articles/s41598-022-15547-2>).

Por otro lado, usamos una aproximación diferente enfocada en el análisis de genes concretos, para estudiar por primera vez en datos de expresión génica i) el sesgo de género observado en casos COVID-19 grave a través del análisis específico de la expresión del gen candidato TLR7, y ii) la posible relación entre la infección por SARS-CoV-2 y rutas oncogénicas analizando la expresión del gen onco-supresor TP53 en pacientes con infección aguda y pacientes con COVID persistente. Para ello re-analizamos los datos generados en los dos estudios anteriores complementados con nuevos datos descargados de repositorios públicos (datos de expresión de COVID persistente pero también datos de epigenómica).

i) Existen abundantes datos epidemiológicos que indican que la incidencia de casos graves de la enfermedad por coronavirus (COVID-19) es significativamente mayor en los hombres que en las mujeres. Además, existen precedentes que indican que la variación genética en el gen TLR7, localizado en el cromosoma X, está asociado a sufrir COVID-19 grave. Igualmente se ha sugerido que el sesgo de género en la incidencia de la COVID-19 podría estar relacionada con el escape del gen TLR7 a la inactivación del cromosoma X durante la embriogénesis temprana en las mujeres, codificando así una dosis doble de su producto génico en comparación con los hombres. Para intentar averiguar si este fenómeno de escape podría estar detrás de esta respuesta diferencial entre hombres y mujeres a la COVID-19 grave, analizamos la expresión de TLR7 en dos cohortes de fase aguda de pacientes con COVID-19 que utilizaron dos plataformas tecnológicas diferentes, una de ellas en un contexto multi-tejido que incluía muestras de saliva, nasales y de sangre, y una tercera cohorte que incluía diferentes puntos de tiempo post-infección de pacientes con COVID-19 persistente (long-COVID-19). Además, exploramos los patrones de metilación de TLR7 utilizando datos epigenómicos de una cohorte independiente de pacientes con COVID-19 estratificados por gravedad y sexo. Nuestros datos indicaron una regulación sistémica a la baja de TLR7 en los hombres con respecto a las mujeres en los casos más graves de COVID-19. Esta regulación a la baja es independiente del tejido y de la clasificación de gravedad utilizada, siendo la sangre el tejido que muestra las mayores diferencias de expresión. También encontramos diferencias en los patrones de metilación del gen TLR7 en hombres con enfermedad grave, sugiriendo que la interacción entre la metilación y la desmetilación del gen podría estar contribuyendo a la condición de gravedad de la COVID-19 en los hombres. Este es el primer estudio que analiza los niveles de expresión de TLR7 en diferentes gravedades y tejidos en el contexto de la COVID-19. Este estudio ha sido aceptado para su publicación en la revista D1 Environmental Research (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36152884/>).

ii) Varios estudios han planteado la hipótesis de que una inhibición a largo plazo de p53 por el SARS-CoV-2 podría ser carcinogénica. Hoy sabemos que el SARS-CoV-2 ha desarrollado estrategias similares a las de otros virus para controlar p53 secuestrando la proteína a través de antígenos virales y, en última instancia, provocar su degradación. El deterioro de p53 podría verse como una estrategia del virus para aprovechar las vías celulares controladas por esta proteína en su propio beneficio durante la fase aguda de la infección, evadiendo así la respuesta inmunitaria del huésped y facilitando su replicación. Para estudiar el comportamiento del gen TP53 (que codifica para la proteína p53) durante la infección por SARS-CoV-2 examinamos tres conjuntos de datos de expresión génica, dos

con pacientes en infección aguda y uno con pacientes long-COVID. Nuestro estudio ha demostrado que TP53 está regulado a la baja durante la infección aguda por SARS-CoV-2 y también en pacientes long-COVID que han padecido una enfermedad COVID-19 grave. Los pacientes leves/moderados mostraron una reducción estadísticamente significativa de la expresión de TP53 en comparación con los controles sanos a las 16 semanas, y una reactivación hacia los valores normales a las 24 semanas. Sin embargo, en los pacientes graves/críticos, la expresión de TP53 se reduce progresivamente hasta al menos 24 semanas, sin que haya indicios de recuperación del nivel de expresión de TP53 observado en los controles. Nuestro estudio muestra pruebas convergentes de que p53 puede reducirse de forma aguda y persistente tras una infección grave por SARS-CoV-2. Una reducción persistente de las funciones de p53, como podría ser el caso de los pacientes graves de SARS-CoV-19, puede constituir un factor de riesgo de oncogénesis. Esta reducción a largo plazo de p53 podría desencadenar la aparición del cáncer o contribuir a empeorar el curso de los pacientes con un proceso tumoral en curso. Nuestros resultados en relación a este estudio han sido publicados en la revista D1 Journal of Infection ([https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(22\)00469-8/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(22)00469-8/fulltext)).

Expediente	IN845D 2020/35
Título	Evaluación de compuestos senolíticos para el tratamiento del Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
Investigador principal	Manuel Collado Rodríguez

Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, IDIS
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, CHUS
Travesía da Choupana s/n, Edificio C, Planta -2, Laboratorio 13
Santiago de Compostela 15705
manuel.collado.rodriguez@sergas.es

ANTECEDENTES

El rápido desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), secundario a la enfermedad por coronavirus 2019 (Covid-19), es una complicación grave que puede provocar insuficiencia respiratoria antes de la sepsis y el choque séptico, insuficiencia multiorgánica y la muerte. El SDRA se desarrolla con mayor frecuencia en pacientes de edad avanzada cuyos pulmones sufren inflamación y actualmente se trata mediante intubación endotraqueal y respiración mecánica. Pese a determinados avances durante estos ya dos años de pandemia, se desconoce en detalle la base de la mayor susceptibilidad y gravedad de la infección en pacientes mayores. En esta propuesta especulábamos que la senescencia celular, una característica definitoria del envejecimiento del organismo, podría ser una fuerza que contribuya al SDRA, similar a lo que ya se ha descrito para otras enfermedades pulmonares asociadas a la edad. Nos planteamos analizar la respuesta de senescencia en un modelo de ratón previamente conocido de SDRA y probar el potencial terapéutico de un tratamiento senolítico.

OBJETIVOS

Como objetivos de este proyecto tuvimos:

Objetivo 1. Estudio de la participación de la senescencia en el SDRA en un modelo de ratón de la enfermedad.

Objetivo 2. Evaluar el efecto terapéutico de los senolíticos sobre el SDRA

RESULTADOS

Hemos desarrollado un modelo experimental de SDRA basado en la administración de LPS a ratones. En este modelo hemos podido comprobar cómo el desarrollo de SDRA está asociado a la inducción de senescencia celular en pulmón como se demuestra por la presencia de diversos marcadores de este proceso. Además, hemos sometido a estos animales a un tratamiento senolítico que redujo sensiblemente la presencia de células senescentes, así como la fibrosis pulmonar, confirmando que la inducción de senescencia en pulmón es la causa del desarrollo de fibrosis asociada a la SDRA.

Nuestra propuesta científica se ha visto apoyada por trabajos que han sido publicados recientemente y que confirman nuestra hipótesis de que la inducción de senescencia celular en los pulmones de los individuos infectados por SARS-CoV-2 contribuye a la patología desarrollada por los pacientes.