

[Información sobre la COVID Commons \(CIC\) Investigación Lightning Talk](#)

Transcripción de una presentación por Harvey Pollard (Uniformed Services University School of Medicine), 9 de diciembre de 2024



Título: [COVID-19 inflamación de las vías respiratorias se debe a la inhibición de Spike de señalización CFTR](#)

[Harvey Pollard CIC Base de datos Perfil](#)

Premio NIH: [1R01HL167048-01](#)

[YouTube Grabación con diapositivas](#)

[Información del seminario web de CIC de diciembre de 2024](#)

Transcripción Editada: Karem Coca

---

### Transcript/Transcripción

#### *Hoja 1*

Gracias - buenos días a todos, o buenas tardes. El título de esta charla es: "La inflamación en la vía aérea COVID-19 se debe a la señalización CFTR por la proteína de espiga SARS-CoV-2." Ya que todos hemos estado viviendo a través de la pandemia COVID, mucho de esto no será nuevo para ti. Pero el CFTR puede ser nuevo. Significa - es el nombre de una mutación de proteína que causa una enfermedad llamada fibrosis quística. Esto es algo en lo que trabajamos.

Es difícil recordar el nombre de esta proteína, porque la gente que la estudiaba al principio, en el hospital para niños enfermos de Toronto, no tenía idea de lo que hacía. Estaban escuchando una estación de rock, CFTR, Canadian Frequency Toronto, 680 en el dial AM, y decidieron llamarlo CFTR. Así es como recuerdo el nombre - es una forma de dar información sobre lo que la gente estaba haciendo en los viejos tiempos cuando no sabían exactamente lo que estaban haciendo. En cualquier caso, la proteína en sí es realmente crítica, como muchas de las proteínas o genes que se encuentran en enfermedades raras - son raras porque es difícil vivir sin ellas. Nos acompañan colegas de USAMRI, el Instituto de Investigación Médica del Ejército de los Estados Unidos sobre Enfermedades Infecciosas, donde se estudian los virus más graves. Pudimos hacer esto - esta es una colaboración - y el artículo sobre el que gran parte de los datos que voy a hablar fue publicado recientemente en informes científicos. Hung Caohuy et al se muestra como una cita en la parte inferior de esta diapositiva.

## *Hoja 2*

Los objetivos de este proyecto fueron comprender, en primer lugar, el mecanismo por el cual se produjo la tormenta de citocinas pro-inflamatorias en las vías respiratorias del COVID-19. Es esencialmente letal. Segundo, encontrar una estrategia terapéutica para suprimir la tormenta. Por cierto, si ves que el trimer de espiga se mueve, se supone que se mueve, no son tus ojos.

## *Hoja 3*

En primer lugar, desarrollamos un ensayo in vitro para la unión de proteínas spike a ACE2. Luego, buscamos drogas candidatas que pudieran bloquear la interacción. Finalmente, encontramos que los glucósidos cardíacos como digitoxina, digoxina o ouabain eran potentes inhibidores de la unión Spike-ACE2. Después de pasar por muchos estudios que examinaban la unión, nos preguntamos si alguno de esos medicamentos que fueron aprobados en todo el mundo - y se licencia digoxin aquí en los Estados Unidos - realmente interfiere con la infección.

## *Hoja 4*

Esta diapositiva muestra que la infectividad del virus de datos es inhibida por digitoxina y otros glucósidos cardíacos en las células pulmonares humanas - la célula A549, muy típica. En la parte superior se muestra una serie de curvas de respuesta de dosis. El eje x es la concentración de la droga y el eje y en verde son los valores inhibidores, o valores K12, esencialmente.

La parte superior es un hinchado, esta es una serie de curvas de respuesta de dosis en el eje x de la concentración del fármaco y el eje y en valores inhibitorios verdes K1 valores esencialmente EC50 valores para los tres fármacos glucósidos cardíacos. Están en rangos de concentración usados para tratar la insuficiencia cardíaca, curiosamente. El color rojo es la citotoxicidad. Es aproximadamente diez veces mayor que los respectivos valores de EC50 inhibitorios, lo que significa que se pueden usar estos fármacos sin llegar a inhibir las células. Las dos cajas de abajo son los nucleidos de esteroides que van con estos medicamentos menos los azúcares. No son muy eficaces. Esto fue publicado en informes científicos en 2021, así que estamos muy contentos de ver que pudimos transmitir algunos experimentos in vitro a algo que se estaba aproximando in vivo.

## *Hoja 5*

Hay información preliminar adicional sobre CFTR que quiero enfatizar. Es un gen responsable del control de la inflamación en la rara enfermedad genética de la fibrosis quística. Y como veremos en las próximas diapositivas, es esencial para el control de la inflamación en la vía aérea del COVID-19.

## *Hoja 6*

Voy a leer la primera parte porque dice lo que quiero decir y seguimos. Al principio de la pandemia de COVID-19, se descubrió que la tormenta letal de citocinas se debía a la activación de las vías TNF alfa y NF Kappa B, pero nadie sabía cómo ocurrió.

En el centro de esta diapositiva, se puede ver una vía de señalización que comienza con el TNF alfa, que luego se une a un receptor TNF en la membrana de la célula. Ahí, se conecta al primer adaptador intracelular, una molécula llamada TRADD. El DD significa Dominio de la Muerte, muy inquietante. Esa molécula es un director crítico para llevar todas esas señales de TNF alfa a la IKK'osome que luego se une, o fosforilan a I kappa B alfa, libera suficiente Kappa B, que se mueve hacia el núcleo y genera todas estas citocinas - IL-6, IL-8, TNF alfa, y un grupo de ARNm, que luego se sintetizan y secretan en las vías respiratorias y en el resto del cuerpo. En realidad, en el contexto de una tormenta de citocinas, nosotros, al estudiar esta situación con la fibrosis quística, encontramos que había algunos que buscaban drogas alternativas como digitoxina - ya les hemos mostrado que interfieren con la infección. Encontramos que la digitoxina, la digoxina y el ouabain básicamente bloquean ese proceso. Puedes ver en letras rojas y pequeño bloque, la T-Junction, que cuando haces un complejo binario entre TNF alfa y TNFR1 uno, quiere unirse a TRADD pero no puede. Así que los primeros experimentos se hicieron en células HeLa viejas y simples, y eso demostró realmente dónde estaba el problema. Una función de la CFTR es bloquear esa molécula TRADD y inhibir así la tormenta de citocinas en las vías respiratorias de la FC, pero de hecho, dado que la digitoxina y la CFTR están trabajando en el mismo lugar, esencialmente, los fármacos están fenocopiando o imitando la CFTR. Se planteó la hipótesis de que la tormenta de citocinas COVID-19 se debió a la pérdida de CFTR y que los glucósidos cardíacos, que básicamente imitarían CFTR, podrían ser terapéuticos.

#### *Hoja 7*

Así que la pregunta era, ¿la exposición a proteínas de picos reduce CFTR? La forma en que hicimos este experimento fue usando un organoide pulmonar humano preparado en la interfaz aire-agua. Pones algunas células basales que recibimos de un colega en esta interfaz aire-agua y durante 28 días de cultivo, creces un epitelio hermoso. Puede ver las células de la copa, las células auxiliares y otros tipos de células verificadas por inmunofluorescencia a continuación. En el lado derecho se utilizaron análisis de Western blot de los efectos de la proteína spike sobre los niveles de CFTR. A lo largo del eje horizontal aumentamos la concentración en la primera columna superior, A, la proteína de espiga ancestral o original de Wuhan. Causa una pérdida de CFTR dependiente de la dosis, significativamente dependiente de la dosis. Entonces examinamos una cepa mucho más biológicamente potente. Esta es la cepa sudafricana Beta, mucho más potente, como resultó ser, como un virus COVID. Mucho más potente en la reducción de CFTR. Se ve la diferencia en los gráficos de barras y en las gráficas occidentales. Así que concluimos que la exposición a proteínas spike reduce los niveles de CFTR.

#### *Hoja 8*

La siguiente pregunta fue si las proteínas de la espiga activan la señalización pro inflamatoria del kappa B del NF. Bueno, en el gráfico que mostré de las vías de señalización es una serie de proteínas. Comenzando desde arriba, TNF alfa, TRADD, y así sucesivamente. Estos se activan si CFTR se pierde. Al aumentar la concentración de la proteína spike, nuevamente, estamos usando la cepa Wuhan aquí, todas esas flechas rojas a la izquierda en realidad muestran lugares donde está ocurriendo un aumento. Si miras más allá, verás que TRADD en realidad está aumentando.

Al final, IL-8, que es una de las citocinas que medimos, también está aumentando. Así que sí, la proteína de espiga activa la señalización pro-inflamatoria NF kappa B.

### *Hoja 9*

Aquí es donde nuestros colegas de USAMRI se pusieron a la altura. ¿Los glucósidos cardíacos protegen las células epiteliales de CFTR perdidas por virus nativos? En el lado izquierdo, verás una trama occidental. Varias cosas se añaden justo en el medio. Donde dice 'virus only', verá que el nivel de intensidad de esa banda CFTR, en este caso es el dímero, se reduce sustancialmente en comparación con el medio de control y que digitoxin y ouabain elevan los niveles. El gráfico de barras básicamente muestra cosas muy similares. Estos son todos basados en cuatro experimentos independientes. La situación real aquí es que todo está muy bien para nosotros realmente hacer experimentos con proteínas de espina dorsal, pero es muy importante verificar que esto está sucediendo en virus reales y enfermedades reales. Esto era algo que nos interesaba mostrar y validar.

### *Hoja 10*

La siguiente pregunta es "¿Cómo se une el pico solo a ACE2, pero también afecta los niveles de CFTR?" ¿Cómo podría ser eso? Una posibilidad era que tal vez el CFTR que existía estaba unido a ACE2 en la membrana celular. Resulta, sí, está unido a ACE2. La parte izquierda de esta figura muestra que, de hecho, CFTR y ACE2 se encuentran tanto en las células basales que componen el epitelio diferenciado como en el epitelio indiferenciado. CFTR está ahí, ACE2 y en realidad todo lo que necesitas para tener una buena infección (siempre y cuando puedas llamar a una infección agradable). En el lado derecho, muestra que si tomas un anticuerpo contra ACE2 y lo inmuno-precipitas, luego prueba ese inmuno-precipitado para la CFTR ligada, seguro, puedes encontrar mucha CFTR. Estos son dos experimentos duplicados, el NRS es simplemente un suero normal de rata. También se puede encontrar CFTR inmunoprecipitado solo en las células basales, por lo que es básicamente accesible en todas las diferentes partes del epitelio.

### *Hoja 11*

Quiero hacer una pausa aquí para recordar o enfatizar a todos que el CFTR es un canal de cloruro activado por AMP cíclico. Ese canal es crítico para mantener las vías respiratorias hidratadas. Cuando el canal no está allí, la vía aérea se seca y ocurre la inflamación. En este caso particular, tenemos la proteína CFTR en la superficie de la célula. Arriba es la vía aérea, abajo es el interior de la célula. La norepinefrina o epinefrina puede unirse a una proteína - otra proteína que se une a CFTR se llama el receptor adrenérgico beta 2. Esto genera AMP cíclico, la proteína quinasa A se activa. Luego etiqueta los fosforilatos con CFTR. La actividad del canal se activa. Se puede ver una molécula de cloruro que se mueve hacia afuera.

¿Por qué muestro esto? Bueno, si la proteína se pierde, esperas que también se pierda la actividad del canal. Es una especie de prueba. ¿Es realmente cierto que la proteína spike reduce y elimina todo lo asociado con el CFTR?

### *Hoja 12*

En el lado derecho se encuentra un experimento de cámara clásico. Pero podríamos mirar hacia el eje horizontal en el lado izquierdo - es un curso de tiempo y el eje vertical es la actividad del transporte de cloruro desde un lado de la interfaz líquido al lado aire. Si agregas algo de IBMX o algo para estabilizar el [inaudible], el verde - el canal se abre. Puedes ver una señal muy agradable. Si usted gira y añade un inhibidor de CFTR, éste bajará, pero si agrega una proteína spike, pierde aproximadamente el 50% de la señal. En este experimento, el pico es Wuhan, por lo que es el menos potente de estos, pero si se añade ouabain o digitoxina o digoxina a este cultivo celular que está cultivando durante 24 horas, el efecto de pico se pierde. En el lado derecho, puedes ver esa historia con los gráficos de barras, pero justo debajo donde dice "CFTR", puedes ver que cuando has agregado el pico, obtienes aún menos CFTR. Así que la proteína de pico causa la pérdida de la proteína CFTR en el mismo sistema y la pérdida de la proteína CFTR se salva por el tratamiento del epitelio con los tres glucósidos cardíacos. La pérdida de actividad del canal, la pérdida de proteínas, ocurren al mismo tiempo. Eso significa que creemos haber abordado de manera sólida el concepto de que la proteína spike, y el virus para ese asunto, ha reducido los niveles de CFTR.

### *Hoja 13*

Nuestras conclusiones son que los datos apoyan la hipótesis de que la tormenta de citocinas COVID-19 se debe a la pérdida de CFTR. La segunda conclusión es que la pérdida de CFTR activa TRADD para conducir la señalización TNFa/NF kappa B. La digitoxina, digoxina y ouabain fueron quizás terapéuticas, primero bloqueando la infección, inhibiendo el virus de unirse a ACE2, y segundo inhibiendo la inflamación, inhibiendo TRADD, y así sustituyendo la pérdida de CFTR. Sugerimos que la ventaja de la glicosita cardíaca es que se trata de una familia de fármacos con dos actividades terapéuticas candidatas simultáneas para el COVID-19.

### *Hoja 14*

Tenemos que tener estos reconocimientos. En parte, nuestro laboratorio en el Uniform Services y también los laboratorios de Herbert y Florez en USAMRIID. También tenemos que tener un aviso del Departamento de Defensa que diga que no estamos tratando de vender nada a nadie. Te agradecemos por eso.

### *Hoja 15*

Gracias - Estoy a la espera de cualquier pregunta que pueda haber más adelante en la presentación.