

eurecat

Centre Tecnològic de Catalunya

Título: Determinación del potencial inhibitorio de diferentes formulaciones sobre la infectividad de un coronavirus humano

Oferta número: 2022-023994

Responsable técnico: Bartosz Tylkowski
bartosz.tylkowski@eurecat.org
977 297 078

Responsable comercial: Ignasi Papell Garcia
ignasi.papell@eurecat.org
618 414 270

Fecha: 11/03/2022

Cliente: SISVILAB, S.L.

Receptor: Miquel Sisteré Manonelles
Director

Dirección: Av. Prat de la Riba, 63, 1r 2ª
25003 Lleida
Tel. 973220314

Páginas 9



Índice

1.	ANTECEDENTES	4
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	4
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1.	SUSTANCIAS TEST	5
3.2.	CULTIVOS CELULARES Y VIRUS.....	5
3.3.	ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE 229E	5
3.4.	CÁLCULOS	6
4.	RESULTADOS	7
5.	CONCLUSIONES	9
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	9
7.	FIRMAS.....	9

1. Antecedentes

SISVILAB solicita a EURECAT la realización de un ensayo para determinar el potencial inhibitorio de diferentes formulaciones sobre la infectividad de un coronavirus humano, el HuCOV-229E. Las formulaciones fueron preparadas por la Unitat de Tecnologia Química de Eurecat, en base a las combinaciones siguientes:

- Miel
- Miel + Extracto natural
- Extracto natural + Biopolímero
- Miel + Biopolímero
- Miel + Extracto natural + Biopolímero

La Unitat de Nutrició i Salut de Eurecat realizó el diseño experimental partiendo de los descritos por *de Wilde* y colaboradores ¹ o Brown y colaboradores ², incubando diferentes concentraciones de la sustancia test con un inóculo del virus antes de infectar las células huésped (MRC-5) con la mezcla de inóculo-sustancia test.

La infección de las células MRC-5 con el coronavirus 229E tiene como consecuencia la aparición del efecto citopático en dichas células al cabo de unos días post-infección, debido a la replicación viral dentro de las células, que da lugar finalmente a la lisis celular, liberando las partículas virales al espacio extracelular. Así, en caso de producirse una interacción entre la sustancia test y el virus que bloquee la infectividad del virus, se observará una disminución de la toxicidad asociada a la infección por 229E en las células MRC-5.

2. Hipótesis y objetivos

La hipótesis del presente estudio es que las formulaciones en base a miel, extracto natural y biopolímero pueden inhibir la infectividad del coronavirus HuCOV-229E.

El objetivo principal del presente estudio es evaluar la capacidad inhibitoria de las diferentes formulaciones sobre la infectividad del coronavirus humano HuCOV-229E.

3. Materiales y métodos

3.1. Sustancias test

Las sustancias test de este estudio fueron diferentes formulaciones preparadas por la Unitat de Tecnologia Química de Eurecat, en base a las combinaciones siguientes:

- Miel
- Miel + Extracto natural
- Extracto natural + Biopolímero
- Miel + Biopolímero
- Miel + Extracto natural + Biopolímero

3.2. Cultivos celulares y virus

Se utilizó la línea celular MRC-5 (fibroblastos derivados de pulmón), procedente del American Type Culture Collection (ATCC) (CCL-171). Las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo EMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos, tripsinizándose cada 3-4 días, antes de llegar al 90% de confluencia. El coronavirus 229E fue obtenido del ATCC (VR-740) y amplificado en las células MRC-5, según el protocolo de ATCC.

3.3. Ensayos de inhibición de la infectividad de 229E

Para los ensayos de inhibición de la infectividad de 229E, se sembraron las células MRC-5 en placas de 96 pocillos a una densidad de 8.000 células/pocillo, 24 horas antes de los tratamientos.

Se realizaron 8 diluciones seriadas 1:4 de las sustancias test en PBS, siendo la concentración más alta un 20% de la emulsión en PBS. Seguidamente, se mezclaron 0.2 ml de cada dilución con 0.2 ml de un inóculo de 229E diluido en medio EMEM 2% FBS, quedando el inóculo a una concentración infectiva de 1000 TCID₅₀/ml y la concentración máxima de emulsión al 10% (rango analizado de concentraciones analizado en medio: 6x10⁻⁴ %– 10%). Se incubó la mezcla sustancia test-inóculo durante 30 min a 25°C. Se aspiró el medio de los pocillos y se añadió 0.1 ml de cada mezcla sustancia test-inóculo, por triplicado. Se incubó durante 24h a 35°C y 5% CO₂ para permitir la adsorción del

virus por parte de las células MRC-5. Seguidamente se aspiró el medio de las células, se añadió medio EMEM 2% FBS y se incubaron las células durante 4 días más a 35°C y 5% CO₂. Como control positivo, se utilizó cloroquina (Sigma C6628), realizando el mismo procedimiento descrito para la sustancia test, y con 8 diluciones seriadas 1:4, con un rango de concentraciones final en medio de 7.81×10^{-3} – 132 µM.

Se realizaron controles de toxicidad de todas las concentraciones de la sustancia test y la cloroquina, mezclando 0.2 ml de cada concentración con 0.2 ml de medio EMEM 2% FBS sin virus, para determinar la toxicidad asociada a la sustancia test.

Al cabo de 5 días post-infección, se analizaron las diferencias en la viabilidad celular asociadas al efecto citopático del virus o a la toxicidad de los tratamientos mediante el ensayo MTT³. El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que mide la actividad de enzimas que transforman la molécula MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) a formazan, de color púrpura. Brevemente, se aspiró el medio de los pocillos y se añadió a cada pocillo 0.1 ml de solución 1 mg/ml MTT en EMEM, y se incubó a 37°C durante 2 h. Seguidamente, se aspiró la solución MTT, se disolvieron los cristales de formazán en 0.1 ml de isopropanol y se leyó la absorbancia a 570 nm (660 nm de referencia). La media de los valores de absorbancia de los controles sin infectar se consideró el 100% de viabilidad celular.

3.4. Cálculos

- **CC₅₀**: *half maximal cytotoxic concentration*. Concentración del compuesto de interés que provoca un 50% de toxicidad. Valores de CC₅₀ bajos indican una mayor toxicidad. Se obtuvo mediante una [REDACTED]
- **EC₅₀**: *half maximal effective concentration*. Concentración del compuesto de interés que inhibe un 50% la toxicidad provocada por la infección viral. Valores bajos de EC₅₀ indican mayor inhibición.
- **SI**: *Selectivity index*. Se calcula dividiendo la CC₅₀ por la EC₅₀. Cuanto mayor sea el SI, mejor relación entre toxicidad y efecto presenta el compuesto.

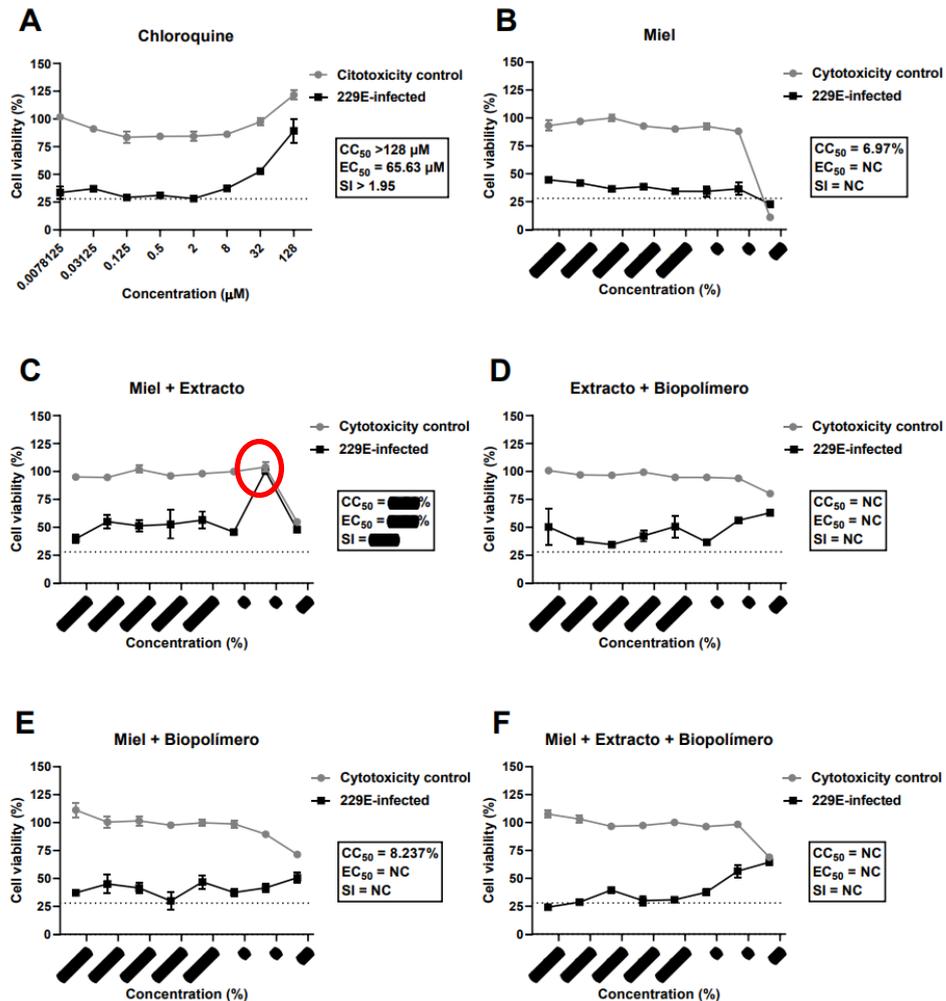
Los valores CC₅₀ y EC₅₀ se obtuvieron mediante regresiones no lineales, con el software GraphPad Prism 9.0.1.

4. Resultados

Tal y como puede observarse en la Figura 1A, la cloroquina, usada como control positivo en el presente experimento, no mostró citotoxicidad en las dosis testadas y mostró actividad antiviral clara en las concentraciones altas testadas, con una EC_{50} de $65.63 \mu M$, resultando así en un SI de >1.95 .

En cuanto a los resultados de los productos de interés, no se observó actividad antiviral clara de las formulaciones "Miel" (Fig. 1B) ni "Miel + Biopolímero" (Fig. 1E), mostrando la miel una toxicidad severa a un $\blacksquare\%$ de concentración. Para la mayor parte de las formulaciones no fue posible calcular los valores EC_{50} , CC_{50} y SI, debido a que no se detectó una curva de inhibición clara de los efectos de la infección para la mayoría de los productos. Sin embargo, los resultados parecen indicar un cierto efecto antiviral de la formulación "Miel + Extracto + Biopolímero", que a concentración $\blacksquare\%$ aumentaba significativamente la viabilidad de las células infectadas sin producir toxicidad a las células, la cual se empezaba a producir a concentración $\blacksquare\%$ (Fig. 1F). Aunque menos destacado, también se observó un cierto efecto antiviral de la formulación "Extracto + Biopolímero", a concentración $\blacksquare\%$, sin una toxicidad destacable, la cual también empezaba a producirse a 10% de concentración (1D).

El resultado más favorable se dio con la formulación "Miel + Extracto", ya que a concentración $\blacksquare\%$ conseguía revertir totalmente la toxicidad generada por la infección de HuCOV-229E, sin causar toxicidad a las células. Descartando los resultados de concentración $\blacksquare\%$, la cual producía toxicidad a las células MRC-5, se obtuvo una EC_{50} de $\blacksquare\%$, una CC de $\blacksquare\%$ y un SI de \blacksquare . Aunque los resultados de dicha formulación no son totalmente comparables con los de la cloroquina, ya que la cloroquina no mostró toxicidad en ninguna concentración, lo que hace que no se pueda saber con exactitud su índice de selectividad, el efecto de la formulación "Miel + Extracto" al $\blacksquare\%$ fue superior al de cualquier dosis analizada de la cloroquina.



5. Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran un efecto antiviral de la formulación “Miel + Extracto” al 100% de concentración, concentración con la que se consiguió revertir totalmente la toxicidad causada por la infección con coronavirus 229E. Estos resultados sugieren que para obtener un efecto antiviral con la formulación “Miel + Extracto”, se debería usar a una concentración que garantice que queda a una concentración del 100% al mezclarse con la saliva. También se observaron ciertos efectos antivirales de las formulaciones “Extracto + Biopolímero” y “Miel + Extracto + Biopolímero” a concentración 100%, aumentando significativamente la viabilidad celular de células MRC-5 infectadas con coronavirus 229E en comparación con células no tratadas, aunque sin llegar a revertir totalmente la toxicidad causada por la infección.

6. Bibliografía

1. de Wilde, A. H. *et al.* Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4875–84 (2014).
2. Brown, A. J. *et al.* Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **169**, (2019).
3. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).

7. Firmas

Responsable técnico	Informe validado por
	
Dr. Bartosz Tylkowski Cap de línia	Dr. Ricard Garcia-Valls Director Unitat Tecnologia Química