



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESIS POR COMPILACIÓN DE ARTÍCULOS
DOCTORADO Pro.In.Bio

**GENERACIÓN DE MODELOS MURINOS
PARA EL ESTUDIO DE VIRUS
ZONÓTICOS EMERGENTES**

MSc. ANA PAULA AREVALO

Tutora: Martina Crispo, PhD

Cotutor: Gonzalo Moratorio, PhD

Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio

Institut Pasteur de Montevideo

Marzo 2026

ÍNDICE

1- RESUMEN	5
2- INTRODUCCIÓN	8
2.1 Virus de la Hepatitis Murina y su semejanza con SARS-COV-2.....	11
2.2 Reposicionamiento de drogas.....	13
2.2.1 Ivermectina.....	13
2.2.2 Hemina y Cloroquina.....	14
2.3 Virus Mayaro.....	16
3- PREGUNTAS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	19
4- OBJETIVOS	20
4. Objetivo general.....	21
4.1 Objetivo específico 1: Coronavirus murino (MHV)	21
4.1.1 Establecer el modelo murino de infección por MHV	22
4.1.2 Evaluar la acción de la IVM en la fase aguda de la infección.....	21
4.1.3 Evaluar la acción de la Hemina (H) en la fase aguda de la infección.....	21
4.1.4 Evaluar la acción de la Cloroquina (CQ) en la fase aguda de la infección.....	21
4.1.5 Evaluar la acción combinada de la H y CQ en la fase aguda de la infección.....	21
4.2 Objetivo específico 2: Virus Mayaro (MAYV).....	21
4.2.1 Establecer el modelo murino por infección de MAYV	21
4.2.2 Evaluar la existencia de transmisión vertical cuando la infección se produce en dos estadios diferentes de la preñez.....	21
4.2.3 Evaluar la posibilidad de transmisión sexual durante la fase aguda de infección.....	21
4.2.4 Puesta a punto de un modelo de MAYV reportero	21
5- PRINCIPALES RESULTADOS	22
5.1 Biomodelos: MHV – MAYV.....	23
5.2 Reposicionamiento de drogas.....	23
MHV – IVM – HEMINA – CLOROQUINA.....	23

5.2.1 La ivermectina reduce la infección por coronavirus <i>in vivo</i> en un modelo experimental murino.....	24
5.2.2 Presencia sistémica de SARS-CoV-2 y MHV en muestras de sangre.....	25
5.2.3 Potenciación de la infección viral inducida por hemina en el modelo de MHV.....	25
5.2.4 Efectos mitigadores de la cloroquina sobre la infección por MHV potenciada por hemina.....	26
5.2.5 El tratamiento con hemina y cloroquina atenúa la carga viral y normaliza las alteraciones hematológicas en la infección por MHV.....	26
5.2.6 Otros estudios de reposicionamiento de drogas.....	29
5.2.6.1 El bloqueo de PD-1/PD-L1 revierte un eje inmunitario innato-adaptativo disfuncional en la enfermedad crítica por β -coronavirus.....	29
5.2.6.2 Identificación precisa de los nodos clave en la vía del IFN- γ en respuesta a la infección por SARS-CoV-2.....	29
5.2.6.3 Farmacocinética, patología y eficacia de los inhibidores de la proteasa principal de SARS-CoV-2 VPC285785 y VPC285786 en un modelo murino de infección por coronavirus.....	30
5.2.6.4 PROYECTO: Preclinical development of a nanotechnology-based aerosol with tocilizumab to fight COVID-19, Fiocruz- Institut Pasteur de Montevideo – USP.....	31
5.2.6.5 Investigating surface adsorption of Tocilizumab on polymer nanoparticles: a comprehensive biophysical analysis for efficient lung delivery.....	32
5.2.6.6 Exploring IFN- γ yin-yang in Coronavirus defense.....	32
5.3 MAYV.....	33
5.3.1 Tropismo viral y parámetros fisiopatológicos asociados.....	33

5.3.2	Transmisión vertical de MAYV dependiente del estadio gestacional.....	33
5.3.3	Tropismo por tejidos reproductivos y detección de MAYV en esperma.....	34
5.3.4	Imagenología <i>in vivo</i> : diseminación rápida y persistencia musculoesquelética de MAYV.....	34
6-	CONCLUSIÓN GENERAL.....	36
7-	PERSPECTIVAS.....	39
7.1	Profundizar en los mecanismos de transmisión no vectorial de MAYV.....	40
7.2	Estudios mecanísticos de patogénesis de MAYV.....	40
7.3	Desarrollo de modelos experimentales para virus emergentes.....	40
8-	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	42
8.1	Artículos.....	43
8.1.1	Publicados en primera autoría.....	43
8.1.2	Publicado en colaboración.....	43
8.1.3	En redacción.....	44
8.2	Presentaciones en eventos científicos.....	44
9-	BIBLIOGRAFÍA.....	46
10-	AGRADECIMIENTOS.....	59

1-RESUMEN

Las enfermedades virales emergentes de origen zoonótico representan un desafío creciente para la salud pública, generando la necesidad desarrollar modelos biológicos *in vivo* bien caracterizados para estudiar los mecanismos de infección, patogénesis y transmisión viral y estrategias terapéuticas. El objetivo de esta tesis fue establecer y caracterizar dos modelos virales: virus de la hepatitis murina (MHV) y virus Mayaro (MAYV), integrando aproximaciones virológicas, fisiopatológicas, hematológicas, de transcriptómica y de imagenología. En el modelo de infección por MHV (subrogante de SARS-CoV-2) se evaluaron estrategias de reposicionamiento farmacológico. La Ivermectina redujo la carga viral hepática y mejoró el estado de salud de los animales infectados, sin evidenciar una modulación global de la respuesta inmune. En contraste, la Hemina favoreció la infección por el coronavirus murino, incrementando la diseminación sistémica y la carga viral en tejidos y sangre, aportando evidencia sobre el rol del eje hemo-virus en la patogénesis viral. Por su parte, el tratamiento combinado con Hemina y Cloroquina atenuó parcialmente la pérdida de peso y la patología orgánica, redujo las alteraciones histológicas en hígado, pulmón y bazo y disminuyó la carga viral sistémica. Además, contribuyó a normalizar las alteraciones hematológicas inducidas por MHV y el título viral en sangre, lo que sugiere que la cloroquina puede mitigar los efectos proinfectivos de la hemina y limitar la diseminación viral. Este modelo permitió además evaluar otros fármacos en estudios colaborativos, como Tocilizumab y los inhibidores VPC285786 y VPC285785, destacándose este último como un potencial antiviral oral frente a SARS-CoV-2. Por otra parte, se estableció un modelo murino de infección por MAYV donde se observó diseminación sistémica temprana con compromiso de tejidos somáticos, musculoesqueléticos y reproductivos, acompañada de alteraciones hematológicas compatibles con una respuesta sistémica a la infección viral. En el contexto de la preñez, los resultados que el estadio gestacional condiciona la permisividad placentaria y la exposición fetal al virus. Asimismo, la detección de virus infectivo en tejidos reproductivos y espermatozoides aportó evidencia compatible con una potencial transmisión sexual, aunque con baja eficiencia. El uso de imagenología *in vivo* permitió un seguimiento longitudinal de la infección, confirmando la diseminación temprana y la persistencia viral en tejidos musculoesqueléticos. En conjunto, esta tesis refuerza la relevancia de los modelos murinos como plataformas experimentales robustas para la investigación preclínica en virología y para la generación de conocimiento con proyección traslacional en el estudio de virus emergentes de impacto en salud pública.

2-INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19 (1–3), causada por el coronavirus SARS-CoV-2, constituyó un punto de inflexión para la investigación biomédica mundial al evidenciar la necesidad urgente de comprender, en un contexto de emergencia sanitaria global, los mecanismos de patogénesis viral, la diseminación sistémica y las respuestas de un hospedador frente a un virus emergente. Desde las etapas iniciales del brote, la generación de conocimiento científico se vio condicionada no solo por la novedad del agente etiológico, sino también por profundas limitaciones estructurales, logísticas y sociales que impactaron de manera directa en la capacidad de respuesta experimental a nivel global.

El estudio experimental de SARS-CoV-2 requiere condiciones de bioseguridad de nivel 3 (tanto laboratorios (BSL3) como bioterios (ABSL3), una infraestructura altamente especializada que no se encuentra ampliamente disponible. Durante los primeros meses de la pandemia, esta limitación restringió de forma significativa el acceso a modelos experimentales y la posibilidad de desarrollar estudios mecanísticos en numerosos centros de investigación. A estas restricciones se sumaron las consecuencias sociales y económicas derivadas de la pandemia, incluyendo las limitaciones a la movilidad, la reducción de la presencialidad en los laboratorios, la interrupción de las cadenas de suministro y las dificultades para la importación de reactivos, insumos críticos, equipamiento especializado y animales de laboratorio. En conjunto, estos factores impusieron la necesidad de redefinir prioridades y estrategias experimentales, favoreciendo el uso de modelos accesibles, robustos y compatibles con condiciones de bioseguridad de nivel 2.

En este contexto, el desarrollo y la validación de modelos alternativos adquirieron una relevancia estratégica. Los coronavirus murinos, y en particular el virus de la hepatitis murina (MHV), se consolidaron como herramientas experimentales de alto valor para el estudio de la biología de los coronavirus. El MHV ha sido adecuado para abordar aspectos centrales de la infección por SARS-CoV-2 en un hospedador natural y bajo condiciones experimentales controladas de ABSL2. Estos modelos posibilitaron sostener la investigación básica y traslacional en escenarios de recursos limitados, generando evidencia relevante en tiempos compatibles con las necesidades de la salud pública.

De manera paralela, la pandemia de COVID-19 puso de manifiesto la importancia de contar con estrategias terapéuticas rápidas y eficientes, impulsando el interés en el reposicionamiento de fármacos como una herramienta clave en contextos de emergencia.

El desarrollo tradicional de nuevos medicamentos constituye un proceso prolongado y costoso, mientras que el reposicionamiento de drogas permite identificar nuevas indicaciones terapéuticas para compuestos ya aprobados o en uso clínico, cuyos perfiles de seguridad y farmacocinética se encuentran establecidos(4). Durante la pandemia, la combinación de modelos experimentales disponibles con estrategias de reposicionamiento farmacológico demostró ser particularmente productiva, al permitir evaluar de forma ágil intervenciones potenciales incluso en ausencia de infraestructuras de alta complejidad. En este sentido, los modelos basados en MHV ofrecieron una plataforma adecuada para explorar mecanismos de diseminación sistémica, compromiso multiorgánico y alteraciones hematológicas, así como para evaluar el impacto de fármacos con potencial efecto antiviral o modulador de la respuesta del hospedador.

En este contexto, tanto la pandemia en curso al inicio del presente trabajo como las epidemias de Chikunguña y Zika, la emergencia sanitaria asociada al Dengue y la alerta epidemiológica establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en relación con el virus Mayaro, reforzaron la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica y la capacidad de respuesta frente a virus emergentes y reemergentes evidenciando la necesidad de contar con herramientas experimentales robustas que permitan abordar el estudio de estos agentes virales (5–7). En particular, la generación de modelos *in vivo* resulta indispensable para la investigación de los mecanismos de infección, el desarrollo y validación de métodos diagnósticos, la vigilancia epidemiológica, la implementación de medidas de profilaxis y la evaluación de posibles estrategias terapéuticas (8). En este marco, el virus Mayaro (MAYV), un alfavirus emergente circulante en América Latina representa una amenaza creciente para la salud pública debido a su potencial de expansión geográfica, su similitud clínica con otras arbovirosis y la posibilidad de generar patologías persistentes (7). A pesar de su relevancia epidemiológica, los mecanismos de patogénesis y las posibles vías de transmisión no vectoriales de MAYV permanecen insuficientemente caracterizados, lo que subraya la necesidad de modelos experimentales que permitan abordar estos aspectos de manera sistemática.

La presente tesis doctoral se estructura en dos partes complementarias, articuladas a partir del uso de dos biomodelos virales de relevancia sanitaria. La primera parte está orientada al estudio de coronavirus murino, utilizando MHV como modelo para investigar aspectos mecanísticos de la infección por SARS-CoV-2, con especial énfasis en la diseminación sistémica, el compromiso multiorgánico y las alteraciones hematológicas asociadas a la

infección, así como en la evaluación preclínica de estrategias de reposicionamiento de fármacos. La segunda parte se centra en el estudio del virus Mayaro como virus emergente, mediante el establecimiento y caracterización de modelos murinos que permitan analizar su patogénesis, su tropismo tisular y la posible existencia de vías de transmisión no vectoriales.



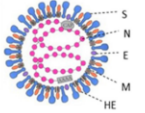
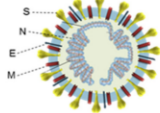
En conjunto, este trabajo adopta un enfoque integrador que reconoce la importancia de contar con modelos experimentales bien establecidos, accesibles y biológicamente relevantes, capaces de sostener la investigación científica incluso en escenarios de crisis sanitaria, restricciones logísticas y limitaciones estructurales. Los resultados derivados de esta tesis buscan contribuir al fortalecimiento de la capacidad científica y sanitaria para la vigilancia, el estudio y la mitigación del impacto de infecciones virales emergentes, aportando evidencia experimental con proyección traslacional y relevancia directa para la salud pública.

2.1 VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA Y SU SEMEJANZA CON SARS-COV-2

El virus de la hepatitis murina es un betacoronavirus de ARN monocatenario envuelto y de sentido positivo (26–32 kb), que infecta de manera natural a los ratones. Pertenece a la familia *Coronaviridae* y comparte características estructurales, genómicas y replicativas con otros betacoronavirus de importancia en salud humana, como SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. MHV comprende un conjunto de cepas con tropismo y virulencia variables, capaces de causar infecciones respiratorias, hepáticas, entéricas y neurológicas, dependiendo de la cepa viral, la vía de inoculación y el fondo genético del hospedador (9). Es altamente contagioso, con transmisión natural por vía respiratoria u oral, y presenta una alta morbilidad, pero baja mortalidad. Dado que tanto MHV como SARS-CoV-2 utilizan el mismo mecanismo para ingresar al núcleo, MHV se considera un modelo interesante para el desarrollo de terapias candidatas contra infecciones por coronavirus en modelos murinos (10,11). A pesar de las múltiples similitudes en la estructura viral, el tropismo orgánico y el curso de la enfermedad, una diferencia crítica radica en que SARS-CoV-2 utiliza ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) como su receptor específico, mientras que los coronavirus murinos emplean el receptor CEACAM-1 (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario) para iniciar la infección (Tabla 1) (12). Por lo tanto, MHV puede aportar información valiosa sobre la biología viral de SARS-CoV-2, aunque no reproduce

completamente las características de este virus. Si bien el conocimiento derivado de modelos murinos de β -coronavirus no puede extrapolarse directamente a los estudios de SARS-CoV-2 en humanos, puede proporcionar datos de prueba de concepto y funcionar como un modelo sustituto o marco de referencia. Debido a su patogenicidad bien caracterizada, su capacidad de inducir respuestas inflamatorias sistémicas y su manejo en condiciones de BSL2, MHV ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental para estudiar la patogénesis de los coronavirus, las respuestas inmunes del hospedador y la evaluación preclínica de antivirales e inmunomoduladores.

Tabla 1 - Comparación entre MHV y SARS-CoV-2 (Adaptado de Körner et al., 2020)
Principales diferencias y similitudes en estructura viral, receptor celular, tropismo tisular, vías de transmisión, mecanismos patogénicos y relevancia como modelos experimentales.

Característica	MHV (Virus de la hepatitis murina)	SARS-CoV-2
Hospedador principal		
Familia / género viral	Coronaviridae / Betacoronavirus	Coronaviridae / Betacoronavirus
Proteínas estructurales	Spike (S), Envoltura (E), Membrana (M), Nucleoproteína (N), Hemaglutinina-esterasa (HE) 	Spike (S), Envoltura (E), Membrana (M), Nucleoproteína (N) 
Receptor celular	CEACAM1	ACE2
Nivel de bioseguridad	BSL-2	BSL-3
Tropismo primario	Mucosa respiratoria nasal y olfatoria, intestino	Neumocitos y vías respiratorias superiores e inferiores
Diseminación sistémica	Pulmón, hígado, médula ósea, cerebro, tejidos linfoides, bazo, órganos reproductivos	Pulmón, corazón, riñón, hígado, intestino, endotelio vascular, sistema nervioso central
Vías principales de transmisión	Vía oral, contacto directo	Gotículas respiratorias, aerosoles, contacto directo, superficies contaminadas
Mecanismos patogénicos clave	Formación de sincitios, necrosis epitelial, disfunción de células inmunes, trombosis, encefalitis con desmielinización	Tormenta de citocinas, disfunción endotelial, aumento de permeabilidad vascular, edema pulmonar, trombosis, disrupción de la barrera intestinal
Rol de la respuesta inmune	Daño tisular predominantemente inmunopatológico	Respuesta inmune innata y adaptativa desregulada
Manifestaciones clínicas	Diarrea, malabsorción, pérdida de peso, neumonía, parálisis flácida de miembros posteriores	Neumonía, distrés respiratorio, fiebre, tos, disnea, síntomas gastrointestinales y neurológicos
Uso como modelo experimental	Modelo sustituto para estudiar tropismo, virulencia e inmunopatogenia de coronavirus	Agente etiológico directo de la COVID-19
Limitaciones del modelo	No reproduce completamente los mecanismos de entrada ni la complejidad clínica del SARS-CoV-2	Requiere modelos murinos adaptados o humanizados

Justificación del uso de MHV-A59 como modelo murino para COVID-19

Las cepas de coronavirus murino difieren en virulencia y tropismo tisular, lo que condiciona su utilidad como modelos preclínicos de SARS-CoV-2. En este contexto, MHV-A59 se destaca por su capacidad de inducir una infección pulmonar y extrapulmonar dependiente de la vía y dosis de inoculación, reproduciendo de manera más adecuada el compromiso multiorgánico característico de la COVID-19, a diferencia de cepas más virulentas o predominantemente neumotrópicas. La infección intranasal con MHV-A59 genera una neumonía aguda y autolimitada comparable a la observada en la mayoría de los casos humanos, mientras que otras vías de inoculación permiten modelar afectación hepática, gastrointestinal y del sistema nervioso central. Además, MHV-A59 comparte con SARS-CoV-2 aspectos clave de la respuesta inmune antiviral, como la activación temprana del interferón tipo I y la inducción de citocinas proinflamatorias. MHV-A59 constituye por lo tanto un modelo robusto para estudiar los mecanismos de patogénesis multiorgánica e inmunidad antiviral de los coronavirus, aportando un marco experimental complementario para la investigación de la COVID-19 (13).

2.2 REPOSICIONAMIENTO DE DROGAS

2.2.1 Ivermectina

La ivermectina (IVM) es un fármaco eficaz y económico, comúnmente utilizado para tratar infestaciones parasitarias. Ha sido aprobada por la FDA para su uso en animales y humanos y está disponible a nivel mundial. Tiene un amplio margen de seguridad, con una LD50 de 30 mg/kg en ratones, y en humanos se administra como tratamiento antiparasitario en dosis de 150–200 µg/kg (14).

Fundamentación

Se han propuesto otros efectos de este fármaco, como actividades antimicrobianas(15), anti-tripanosomiasis/anti-malaria (16) y anticancerígenas (17). Además, varios estudios han demostrado un efecto *in vitro* de la ivermectina contra infecciones por virus de ARN y ADN mediante la supresión de procesos celulares del huésped relacionados con la inhibición del transporte nuclear de proteínas específicas requeridas para la replicación viral (18). La exposición a IVM ha mostrado efectos positivos contra casi 20 tipos diferentes de virus, incluyendo Zika, Dengue y Chikungunya, lo que sugiere un amplio

rango de acción y posibles aplicaciones (19). Aunque se ha propuesto un efecto de la IVM contra coronavirus en estudios previos, aún no se había demostrado una reducción de la carga viral ni una mejora en los parámetros clínicos en modelos *in vivo*. En 2020 se demostró que la ivermectina fue efectiva contra SARS-CoV-2 en un modelo celular *in vitro*, mostrando una inhibición de la replicación viral, lo que la convirtió en un buen candidato para el reposicionamiento en el tratamiento de COVID-19 (20). Sin embargo, la información científica sobre su efecto antiviral *in vivo* contra coronavirus sigue siendo limitada.

2.2.2 Hemina y Cloroquina

La hemina (H) es una droga aprobada para el tratamiento contra las porfirias, una enfermedad genética causada por el déficit en las enzimas que intervienen en la biosíntesis del grupo hemo (21). La expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1), la enzima limitante en la degradación del grupo hemo, se induce frente al tratamiento con hemina. A su vez, HO-1 se induce frente a condiciones de estrés celular y a estímulos pro-oxidativos como el aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como también frente a estímulos proinflamatorios como citoquinas y prostaglandinas (22). A HO-1 se le han atribuido propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-apoptóticas (23). Diversos estudios han reportado que HO-1 puede ejercer una actividad antiviral contra una amplia variedad de virus como Zika, Ébola, VIH y hepatitis B, entre otros (24–27). *In vitro*, el efecto antiviral de la hemina fue evaluada con resultados que evidenciaron su posible acción antiviral (28,29)

La cloroquina (CQ) es un fármaco antipalúdico de uso extendido. Los efectos antivirales de la cloroquina fueron descritos en la década de 1960, aunque el interés por ellos se ha renovado desde el 2006. En la epidemia de SARS del 2003, varios investigadores exploraron la efectividad de diferentes moléculas contra el coronavirus SARS-CoV. Una concentración efectiva (EC50) de 8 μ M de cloroquina, antes o después de la exposición de las células al virus, demostró eficacia *in vitro* (30). Se ha postulado que este fármaco podría inhibir la replicación del SARS-CoV-2 mediante la modificación del pH en la superficie de la membrana celular, lo que inhibiría la fusión viral además de interferir con la replicación de los ácidos nucleicos, la glicosilación, y el ensamblaje y la liberación viral (31).

Fundamentación

El virus SARS-CoV-2, si bien es conocido predominantemente por causar síntomas respiratorios, también ejerce efectos sistémicos que se extienden al corazón, los riñones e incluso el cerebro. La condición resultante, conocida como COVID prolongado (long COVID), se presenta como un síndrome multisistémico que afecta tanto a adultos como a niños, y una proporción significativa —entre el 50 y el 70 %— experimenta síntomas persistentes o de nueva aparición meses después de la infección inicial.

Los síntomas de la COVID prolongada se han vinculado con alteraciones hematológicas sostenidas observadas tras la recuperación. En particular, se han descrito cambios en biomarcadores hematológicos como niveles elevados de ferritina, disminución de la hemoglobina (HGB) y aumento de la velocidad de eritrosedimentación, junto con alteraciones fenotípicas observables en las células sanguíneas que persisten durante meses después de la infección. En consecuencia, resulta evidente que la sintomatología persistente posterior a la infección requiere un enfoque más preciso y exhaustivo sobre las manifestaciones hematológicas.

Además, la infección por SARS-CoV-2 se ha asociado con complicaciones hemolíticas, incluyendo trombocitopenia y anemia. Asimismo, la unión del hemo a proteínas virales y del hospedador, como la proteína 7a, la proteína Spike (S) y ACE2, sugiere un posible papel de los eritrocitos (RBCs) en la diseminación sistémica del virus.

En este estudio, exploramos el impacto multiorgánico de la infección por coronavirus y la participación de los eritrocitos en la propagación de la enfermedad. Utilizamos el MHV-A59, como modelo para obtener información mecanística que pueda orientar el desarrollo de estrategias terapéuticas para la COVID-19. Asimismo, evaluamos el potencial de reposicionamiento de tres fármacos de uso clínico aprobado internacionalmente, seleccionados en función de evidencia previa de actividad antiviral y, particularmente, por su interacción con procesos hematológicos que podrían influir en la infectividad, replicación y propagación del virus.

2.3 VIRUS MAYARO

MAYV es un arbovirus emergente perteneciente al género *Alphavirus* (familia *Togaviridae*), identificado por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954 y responsable de brotes esporádicos en América Central y del Sur. A estos brotes, se le sumó la detección

de casos importados en Europa y América del Norte, siendo el reporte de 2024 uno de los más recientes (32). La presencia constante reemergente ha generado preocupación a nivel de salud pública internacional, lo que motivó la emisión de una alerta epidemiológica por parte de la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud en 2019, en la que se destacó la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica y la capacidad diagnóstica (7). El virus ha sido detectado en varios países de América del Sur, con evidencia serológica adicional en América Central y el Caribe (33–36). Factores antropogénicos como el cambio climático, la urbanización, la movilidad humana y la expansión de vectores como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* incrementan el riesgo de expansión geográfica de MAYV, incluso en países sin transmisión activa, como Uruguay (Figura 1) (37–39).

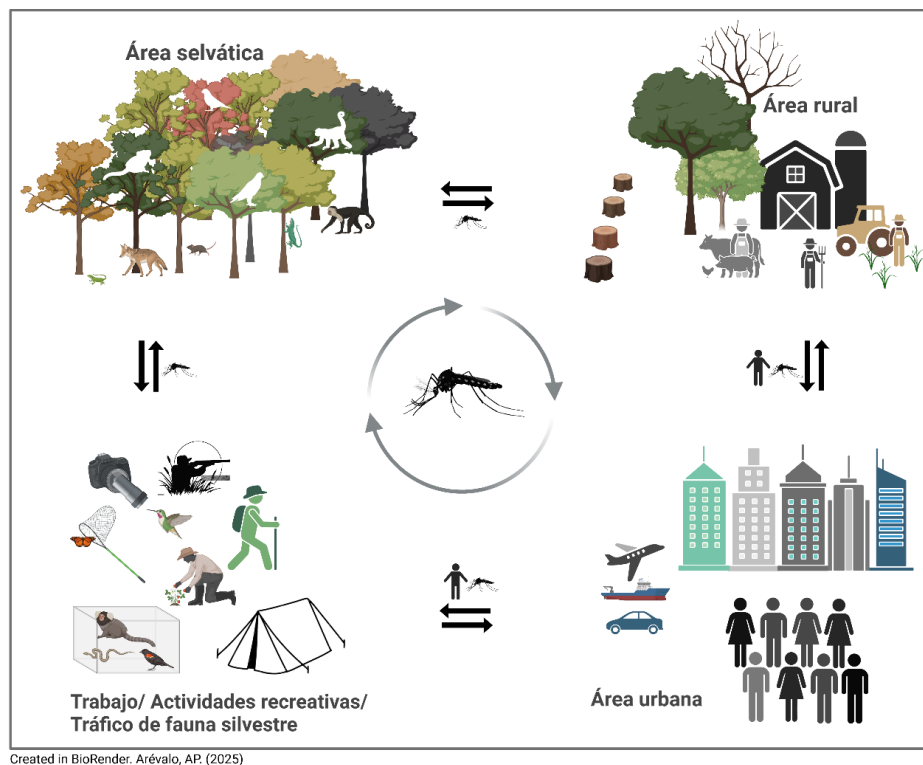


Fig. 1 – Ciclo de transmisión de MAYV. Factores antropogénicos; el cambio climático, la urbanización, la movilidad humana y la expansión geográfica de vectores modulan la dinámica de transmisión, emergencia y dispersión de patógenos virales.

Se estima que aproximadamente 60 millones de personas en América Latina residen en áreas ecológicamente adecuadas para la transmisión de MAYV (40,41). Desde el punto de vista genómico, MAYV es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, con un genoma de aproximadamente 11,5 kb que codifica proteínas no estructurales y

estructurales a partir de dos marcos de lectura abiertos y presenta una alta plasticidad genética que facilita su adaptación a una amplia gama de hospedadores. Se han descrito tres genotipos: D (disperso), L (limitado) y N (nuevo), este último identificado en Perú (42–47). Además de su ciclo selvático, MAYV presenta potencial para establecer transmisión urbana mediante diversos vectores y reservorios vertebrados (48–50). Desde el punto de vista clínico, la enfermedad por virus Mayaro se presenta, en la mayoría de los casos, como un cuadro autolimitado, caracterizándose por fiebre, exantema, cefalea, fotofobia, mialgias y una poliartralgia persistente que puede prolongarse durante meses o años, con un impacto significativo en la calidad de vida de los pacientes. También se han reportado complicaciones hemorrágicas, neurológicas y cardíacas. La similitud clínica con otras arbovirosis, como dengue y chikungunya, junto con la limitada capacidad diagnóstica en regiones endémicas, dificulta el diagnóstico diferencial y contribuye a la subestimación de la carga real de la enfermedad (51,52). Aunque su relevancia epidemiológica es creciente, aspectos clave de la patogénesis del MAYV aún no han sido completamente definidos, incluidos los mecanismos que subyacen a su diseminación sistémica y tropismo tisular, así como su potencial para afectar el embarazo o transmitirse a través de vías no vectoriales. A pesar de que actualmente no existen tratamientos antivirales específicos ni vacunas licenciadas, varios candidatos vacunales se encuentran en desarrollo, lo que refuerza la importancia de mantener una vigilancia epidemiológica sostenida para anticipar y mitigar futuros brotes (53–55).

Fundamentación

El uso de modelos murinos constituye una herramienta clave para estudiar la patogénesis y la diseminación sistémica del virus Mayaro (MAYV), ya que permite un control preciso de la infección y una alta reproducibilidad experimental. Estos modelos facilitan la caracterización del tropismo tisular, la cinética de replicación viral y la evaluación de posibles vías de transmisión no vectoriales, incluyendo la transmisión vertical y sexual en condiciones experimentales controladas, lo cual es fundamental desde el punto de vista epidemiológico para identificar ventanas de susceptibilidad, estimar riesgos de transmisión y generar evidencia robusta que permita anticipar escenarios de emergencia y expansión viral. Para estos estudios se emplearon clones infecciosos del virus Mayaro (MAYV) de tipo silvestre y un clon reportero que expresa nanoLuc (MAYV-nLuc), ambos basados en la cepa TRVL 4675 (genotipo D), aislada originalmente a partir de un caso humano en Trinidad en la década de 1950. La utilización de este modelo reportero de

MAYV, compatible con técnicas de imagenología *in vivo*, permite el seguimiento longitudinal de la infección en el tiempo y constituye una plataforma traslacional valiosa para el estudio de la patogénesis viral y la evaluación preclínica de estrategias terapéuticas.

Esta tesis desarrolló dos plataformas experimentales murinas destinadas a biomodelos de infección basados en el virus de la hepatitis murina y en el virus Mayaro. Ambas plataformas incorporaron la puesta a punto e integración de técnicas de imagenología *in vivo* —radiografía, fluorescencia y luminiscencia—, lo que permitió realizar estudios longitudinales y efectuar un seguimiento en tiempo real de la progresión de las infecciones. Este enfoque contribuyó al refinamiento experimental y a la reducción del número de animales utilizados, en concordancia con los principios de las 3Rs (Reducción, Refinamiento, Reemplazo), principios éticos por los que se rige la investigación con animales (56).

La plataforma basada en MHV se empleó para llevar adelante estudios de reposicionamiento de fármacos, con el objetivo de evaluar intervenciones terapéuticas en un contexto preclínico relevante para la infección por SARS-CoV-2. Por su parte, la plataforma basada en MAYV permitió profundizar en el estudio de la patogénesis viral en el hospedador murino y explorar la posible existencia de vías de transmisión no vectoriales, así como implicancia de la infección cuando esta ocurre durante la preñez.

Los protocolos experimentales ejecutados en este proyecto fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo (CEUA 006-21; MHV y CEUA 010-22; MAYV) y se desarrollaron en su totalidad en la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio del Institut Pasteur de Montevideo en colaboración con el Laboratorio de Evolución Experimental de Virus (LEEV) del Institut Pasteur de Montevideo, el Laboratorio de Cáncer e Inflamación del Instituto de Química Biológica de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

3-PREGUNTAS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

3.1 ¿Es posible generar terapias basadas en el reposicionamiento de fármacos, como la ivermectina, la hemina y la cloroquina para el tratamiento de cuadros patológicos asociados a la infección por coronavirus murino?

El uso de ivermectina, hemina y/o cloroquina, presentan efectos terapéuticos significativos en el tratamiento de la infección por coronavirus *in vitro*, por lo que en un modelo *in vivo* podría mejorar los cuadros fisiopatológicos y favorecer la recuperación.

3.2 ¿Cuál es el tropismo del virus Mayaro en el modelo murino y qué evidencias fisiopatológicas se observan en este modelo? ¿Es posible la transmisión sexual y/o vertical?

El virus MAYARO presenta un tropismo tisular amplio durante la infección aguda en el modelo murino, con alteraciones fisiopatológicas medibles y capaz de favorecer vías de transmisión no vectoriales.

4-OBJETIVOS

4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar modelos murinos experimentales para el estudio de virus emergentes con impacto en la salud pública, que permitan caracterizar los mecanismos de infección, diseminación sistémica, tropismo tisular y patogénesis viral, así como evaluar estrategias terapéuticas en el marco de la investigación preclínica.

4.1 Objetivo específico 1: Coronavirus murino (MHV)

- 4.1.1 Establecer el modelo murino de infección por MHV
- 4.1.2 Evaluar la acción de la IVM en la fase aguda de la infección
- 4.1.3 Evaluar la acción de la H en la fase aguda de la infección
- 4.1.4 Evaluar la acción de la CQ en la fase aguda de la infección
- 4.1.5 Evaluar la acción combinada de la H y CQ en la fase aguda de la infección

4.2 Objetivo específico 2: Virus Mayaro (MAYV)

- 4.2.1 Establecer el modelo murino por infección de MAYV
- 4.2.2 Evaluar la existencia de transmisión vertical cuando la infección se produce en dos estadios diferentes de la preñez
- 4.2.3 Evaluar la posibilidad de transmisión sexual durante la fase aguda de infección
- 4.2.4 Establecer un modelo murino reportero de MAYV para el seguimiento longitudinal de la infección, la caracterización de la patogenicidad en fase aguda y la evaluación de fármacos mediante imagenología *in vivo* como plataforma preclínica.

5-PRINCIPALES RESULTADOS

5.1 Biomodelos de infección: MHV – MAYV

En una etapa inicial, se llevó a cabo la puesta a punto y el refinamiento de modelos murinos de infección por MHV a través de las vías intraperitoneal e intranasal, con el objetivo de generar una plataforma experimental controlada para el estudio de la patogénesis de un coronavirus en un bioterio con nivel de bioseguridad II. Estos modelos fueron implementados en las cepas C57BL/6J, BALB/cJ y el knock-out de IFN- γ (IFN- γ KO), lo que permitió evaluar la infección en distintos contextos genéticos e inmunológicos. Además, se incorporó técnica de administración intratraqueal como nueva ruta alternativa para disposición de fármacos vía intrapulmonar.

En paralelo, se estableció el modelo murino de infección por MAYV en la cepa BALB/cJ, ampliando las capacidades experimentales nacionales para el estudio de arbovirus emergentes.

En ambos modelos, durante el curso de la infección aguda, se realizó una caracterización sistemática de los perfiles hematológicos y bioquímicos de los animales, permitiendo obtener una visión integral de la respuesta fisiopatológica asociada a la infección.

Estas plataformas biológicas de modelos *in vivo* fueron posteriormente disponibilizadas a nivel nacional y regional, incorporando además la posibilidad de realizar estudios mediante técnicas de imagenología *in vivo*. A partir de estos modelos se desarrollaron diversos estudios orientados al reposicionamiento de fármacos y a la evaluación de estrategias terapéuticas en un contexto preclínico.

5.2 REPOSICIONAMIENTO DE DROGAS

MHV – IVM – HEMINA – CLOROQUINA

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-86679-0>

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN Ivermectin reduces *in vivo* coronavirus infection in a mouse experimental model

A. P. Arévalo¹, R. Pagotto², J. L. Pórfido^{3,4}, H. Daghero², M. Segovia^{5,6}, K. Yamasaki⁶, B. Varela⁶, M. Hill^{6,7}, J. M. Verdes⁶, M. Duhalde Vega^{6,7}, M. Bollati-Fogolin² & M. Crispo^{2,10}

Blood matters: the hematological signatures of Coronavirus infection

Ayelen Toro^{1,2,21,52}, Ana P. Arévalo^{1,2,1}, Marianoel Pereira-Gómez^{4,5,21}, Agustina Sabater^{1,2,6}, Eric A. Zizzi^{7,8}, Paula Perbellanachis^{9,5,3}, Gastón Pascual^{9,3}, Sofia Lage-Vickers^{1,2}, Jorge L. Porfido⁹, Ines Achinelli^{1,2}, Rocio Seniuk^{1,2}, Juan Bizzotto^{1,2,6}, Pablo Sanchez^{1,2,6}, Alvaro Olivera⁹, Alejandro Leyva^{9,11}, Pilar Moreno^{4,5}, Alicia Costabile^{5,12,13}, Alvaro Fajardo^{4,5}, Federico Carrión¹⁴, Martín Fló^{14,15}, Natalia Olivero-Deibe¹⁴, Fernando Rodríguez¹⁶, Nicolás Nin¹⁶, Nicolás Anselmino¹⁷, Estefanía Labanca¹⁷, Elba Vázquez^{1,2}, Javier Cotignola^{1,2}, Daniel F. Alonso¹⁸, María P. Valacco^{1,2}, Marcelo Marti^{1,2}, Francesco Gentile^{8,19}, Artem Cherkasov²⁰, Martina Crispo^{2,52}, Gonzalo Moratorio^{4,5,52} and Geraldine Gueron^{1,2,52}

5.2.1 La ivermectina reduce la infección por coronavirus *in vivo* en un modelo experimental murino

Los resultados obtenidos en Arévalo et al 2021 (57) demostraron que la infección viral indujo la enfermedad típica causada por MHV, evidenciando necrosis hepatocelular severa rodeada de una infiltración inflamatoria linfoplasmocítica severa asociada con una alta carga viral hepática en los ratones sin tratar, mientras que los ratones tratados con ivermectina mostraron un mejor estado de salud con una carga viral más baja, y solo algunos presentaron daño histopatológico a nivel hepático. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo infectado + IVM y los ratones del grupo control. Además, los niveles de transaminasas séricas (AST y ALT) fueron significativamente menores en los ratones tratados con IVM que en los animales infectados. Este estudio demuestra que la administración de una dosis única de ivermectina reduce la carga viral hepática de MHV en ratones infectados, mejorando su estado general de salud.

Discusión

Este estudio permitió establecer un modelo murino *in vivo* para la evaluación preclínica de terapias farmacológicas frente a infecciones por coronavirus, subrayando la importancia de los modelos animales para el desarrollo de estrategias terapéuticas y vacunales con proyección traslacional (58). En este contexto, y a partir de evidencia previa mayoritariamente *in vitro* sobre la actividad antiviral de la ivermectina (19), el modelo de infección por MHV permitió demostrar un efecto antiviral *in vivo*, evidenciado por una reducción significativa de la carga viral hepática y una mejora del estado general de los animales tratados.

El efecto observado podría explicarse, al menos en parte, por la inhibición del transporte nuclear mediado por el heterodímero importina $\alpha/\beta 1$, mecanismo compartido por MHV

y SARS-CoV-2(59). Si bien la infección indujo daño hepático, alteraciones metabólicas y cambios hematológicos característicos de infecciones virales, el tratamiento con ivermectina atenuó estos efectos sin modificar sustancialmente la respuesta inmune global. En conjunto, los resultados sugieren que el principal efecto antiviral de la ivermectina en este modelo no estaría mediado por una inmunomodulación general, sino por la interferencia con procesos celulares esenciales para la replicación viral, reforzando el valor del modelo murino de MHV como plataforma preclínica para la evaluación de terapias frente a enfermedades causadas por coronavirus (20,60,61).

5.2.2 Presencia sistémica de SARS-CoV-2 y MHV en muestras de sangre.

Dada la amplia afinidad tisular del SARS-CoV-2, se planteó que el virus podría diseminarse a través de vías hematológicas. En Toro, Arévalo, Pereira-Gómez et al. 2024 (62) se detectó ARN de SARS-CoV-2 en el 70 % de los casos analizados en suero de pacientes con COVID-19. De forma comparable, en el modelo murino se confirmó la presencia de ARN y partículas infecciosas de MHV en plasma, validada además por análisis proteómico que identificó péptidos específicos de la nucleocápside viral. Los estudios proteómicos y hematológicos en ratones infectados con MHV evidenciaron un impacto significativo sobre la fisiología sanguínea, con disminución de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina, junto con leucopenia, linfopenia, neutrofilia, monocitosis y trombocitopenia, así como un aumento de los índices NLR y PLR. Estos hallazgos apoyaron un rol relevante de los eritrocitos en la propagación viral. En concordancia, se detectaron ARN viral y partículas infecciosas en fracciones enriquecidas de eritrocitos, en niveles superiores a los observados en plasma. La microscopía electrónica confirmó la presencia de partículas virales adheridas a la superficie y en el interior de los eritrocitos, con tamaños compatibles con los observados en otros tejidos. En conjunto, estos resultados demuestran la participación del compartimento sanguíneo en la diseminación de SARS-CoV-2 y MHV y su asociación con alteraciones hematológicas significativas.

5.2.3 Potenciación de la infección viral inducida por hemina en el modelo de MHV.

El análisis realizado cinco días después de la infección no reveló efectos macroscópicos o histológicos discernibles en los ratones tratados con hemina (H) en comparación con los ratones infectados con MHV sin tratamiento. Los ensayos bioquímicos tampoco mostraron alteraciones significativas en los niveles de albumina, globulina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa o glucosa entre los ratones infectados con

MHV tratados y no tratados con hemina. La patología renal no se vio afectada por la hemina, aunque los niveles de nitrógeno ureico fueron más elevados en el grupo MHV + H en comparación con MHV. De manera notable, la abundancia de ARN viral en el hígado, pulmón, cerebro, corazón, riñón y bazo de los ratones tratados con hemina (MHV + H) fue mayor en comparación con sus homólogos no tratados (MHV), aunque esta diferencia no se extendió al páncreas. Además, se detectó un aumento significativo en la carga viral en el plasma y en las fracciones enriquecidas de red blood cells (RBCs) del grupo tratado con hemina, junto con títulos virales elevados en estas fracciones. Estos hallazgos implican al hemo como un facilitador de la infección por coronavirus, promoviendo la infectividad viral dentro de las células del huésped.

5.2.4 Efectos mitigadores de la cloroquina sobre la infección por MHV potenciada por hemina.

Se evaluó la capacidad de la cloroquina (CQ) para contrarrestar el aumento de la infectividad por coronavirus inducido por hemina en un modelo murino de infección por MHV. Mientras que la CQ administrada sola no mostró efectos significativos sobre el peso corporal ni mejoró la patología orgánica, su combinación con hemina mitigó parcialmente la pérdida de peso asociada a la infección y mejoró la patología hepática. A nivel histológico, el tratamiento combinado redujo las alteraciones en hígado, pulmón y bazo, preservando mejor la arquitectura tisular y disminuyendo la respuesta inflamatoria en comparación con los animales tratados solo con hemina. Asimismo, el tratamiento combinado se asoció con una reducción de la carga de ARN viral en múltiples órganos, particularmente en cerebro, corazón, riñón y páncreas, en relación con los grupos tratados únicamente con hemina o con CQ. En conjunto, estos resultados indican que la cloroquina puede atenuar los efectos proinfectivos de la hemina en la infección por coronavirus.

5.2.5 El tratamiento con hemina y cloroquina atenúa la carga viral y normaliza las alteraciones hematológicas en la infección por MHV.

El tratamiento combinado con hemina y cloroquina redujo de manera significativa la carga viral y mejoró las alteraciones hematológicas asociadas a la infección por MHV, normalizando los perfiles bioquímicos sanguíneos en comparación con la infección sin tratamiento. Aunque la hemina sola mostró una tendencia a mejorar algunos parámetros hematológicos, estos cambios no fueron significativos. El tratamiento combinado atenuó parcialmente la linfopenia y la neutrofilia inducidas por MHV, sin afectar los recuentos

de monocitos ni plaquetas, y se asoció con una disminución del índice neutrófilos/linfocitos (NLR). Además, produjo una reducción significativa de la carga y del título viral tanto en plasma como en la fracción enriquecida en eritrocitos, destacando la eficacia de la cloroquina para contrarrestar los efectos provirales de la hemina y limitar la diseminación viral en sangre.

Discusión

En este estudio, cuyos resultados publicamos en 2024 (62) presentamos hallazgos novedosos sobre la presencia de material genético de coronavirus y su capacidad infecciosa dentro del compartimento sanguíneo. Aportamos evidencia de que los coronavirus pueden explotar el hemo liberado tras la lisis de los eritrocitos (RBCs), lo que apoyaría la hipótesis sobre su posible papel en la diseminación viral sistémica. En el artículo publicado se incorporan además estudios realizados sobre muestras de pacientes y experimentos *in silico* que aportan resultados fundamentales para esta discusión.

En nuestros análisis *in silico* se demostró la capacidad de la proteína S de MHV para unirse al hemo, reproduciendo interacciones observadas con SARS-CoV-2 (63). Esta unión podría contribuir al aumento observado de la infectividad viral cuando el hemo es abundante, tal como se evidenció en nuestro modelo animal. De manera significativa, nuestros datos indican que la cloroquina (CQ) puede mitigar la influencia proinfectiva de la hemina, revirtiendo alteraciones hematológicas y respaldando la hipótesis de que las interacciones con el hemo desempeñan un papel en la patogenicidad de los coronavirus.

Evidencia creciente vincula la dinámica anómala de los RBCs con la COVID-19, con varios estudios que sugieren que el virus puede inducir hemólisis (64–66). Existe un interés creciente en agentes terapéuticos que apunten a la hemólisis como estrategia protectora frente a manifestaciones graves de la enfermedad. Nuestros resultados concuerdan con hallazgos que demuestran la unión del hemo a la proteína S viral y a la proteína 7a, destacando el posible papel del hemo lábil en la exacerbación de condiciones hemolíticas en pacientes con COVID-19 (63,67,68). Informes que indican niveles elevados de hemo libre en pacientes con COVID-19 grave en comparación con aquellos con enfermedad más leve respaldan la teoría de que el virus puede explotar la lisis de los RBCs (69). La introducción experimental de hemina, un análogo del hemo, en ratones infectados con MHV apoyó esta hipótesis, con un aumento notable del ARN viral en múltiples órganos. Además, observamos un incremento de la carga viral y de las partículas

virales tanto en plasma como en RBCs tras la administración de hemina. De forma interesante, al igual que SARS-CoV-2, MHV-A59 carece de hemaglutinina-esterasa (70,71), lo que sugiere que la hemina se asocia con proteínas virales alternativas. Así, nuestros hallazgos refuerzan el concepto de que la disponibilidad de hemo puede conferir una ventaja de supervivencia al virus, facilitando su replicación y propagación.

A la luz de estos resultados, postulamos que la afinidad de la hemina/hemo por proteínas virales confiere una ventaja distintiva al virus para translocarse a través del sistema del hospedador. Para mitigar este proceso, recurrimos a la CQ, una molécula con afinidad bien conocida por el hemo (72), planteando la hipótesis de que podría neutralizar el efecto facilitador de la hemina sobre la diseminación viral. Las propiedades antivirales documentadas de la CQ frente a diversos virus (73,74) la posicionaron como un fármaco potencialmente reutilizable durante las primeras etapas de la pandemia de COVID-19 (75,76), aunque los ensayos clínicos arrojaron resultados mixtos (77). No obstante, este fármaco multifacético podría no haber sido evaluado plenamente en el contexto de su interacción con el compartimento sanguíneo. Nuestro estudio confirmó que el grupo experimental de H + CQ condujo a una marcada reducción de la abundancia de ARN viral en la mayoría de los órganos, acompañada de una disminución notable tanto de la carga viral como de la infectividad en plasma y RBCs, en comparación con la infección por MHV sola o con MHV + H. Además, observamos mejoras en los parámetros sanguíneos tras el tratamiento H + CQ, lo que sugiere que la presencia de hemo—ya sea suplementado artificialmente o derivado de la hemólisis—y su unión prevista a la proteína S viral pueden conferir una ventaja evolutiva al virus. En conjunto, nuestros datos sugieren que la CQ puede interrumpir efectivamente la ventaja viral proporcionada por el hemo, señalando la necesidad de una reevaluación de su potencial terapéutico, particularmente considerando su efecto sobre la diseminación viral mediada por la sangre. Nuestra investigación ha elucidado que la virulencia multiorgánica de la infección por coronavirus se acompaña de la presencia de partículas virales en el compartimento sanguíneo, subrayando el papel potencial de los RBCs en la infectividad viral. Este hallazgo tiene implicancias significativas para las alteraciones hematológicas observadas en pacientes con COVID-19; por lo tanto, los parámetros sanguíneos podrían desempeñar un papel clave en el desarrollo de tratamientos dirigidos para individuos con manifestaciones graves de la enfermedad.

5.2.6 Otros estudios de reposicionamiento de drogas

En el marco de esta tesis, y destacando la relevancia del modelo experimental para la comunidad científica, se generaron diversas colaboraciones internacionales de las cuales resultaron los trabajos listados a continuación, y se implementó el uso de imagenología para los mismos (Figura 3).

5.2.6.1 El bloqueo de PD-1/PD-L1 revierte un eje inmunitario innato-adaptativo disfuncional en la enfermedad crítica por β -coronavirus.

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abn6545>. La COVID-19 grave se asocia con hiperinflamación y respuestas débiles de células T frente a SARS-CoV-2. Sin embargo, los vínculos entre estos procesos aún no están completamente caracterizados. Además, se desconoce si la manipulación terapéutica de las células T puede beneficiar a los pacientes y de qué manera. Nuestra evidencia genética y farmacológica demuestra que el canal iónico TMEM176B inhibe la activación del inflammasoma desencadenada por SARS-CoV-2 y por un β -coronavirus murino (MHV) relacionado con SARS-CoV-2. Los ratones *Tmem176b*^{-/-} infectados con β -coronavirus murino desarrollaron disfunción de células T dependiente del inflammasoma y enfermedad crítica, la cual fue controlada mediante la modulación de células T disfuncionales con bloqueadores de PD-1. En la COVID-19 crítica, la activación del inflammasoma se correlacionó con células T disfuncionales y con una baja expresión monocítica de TMEM176B, mientras que el bloqueo de PD-L1 restauró la funcionalidad de las células T. En conjunto, vinculamos mecánicamente la disfunción de las células T con la inflamación, respaldando el uso de estrategias de inmunoterapia oncológica para reforzar la inmunidad de células T en la enfermedad crítica por β -coronavirus.

5.2.6.2 Identificación precisa de los nodos clave en la vía del IFN- γ en respuesta a la infección por SARS-CoV-2. <https://doi.org/10.3390/v14102180>.

El interferón gamma (IFN- γ) podría constituir una inmunoterapia adyuvante potencial para pacientes con COVID-19. En este trabajo, evaluamos los perfiles de expresión génica asociados a la vía de señalización del IFN- γ en respuesta a la infección por SARS-CoV-2. Mediante un estudio de casos y controles con pacientes positivos y negativos para SARS-CoV-2, identificamos un enriquecimiento de las vías asociadas a IFN- γ en los pacientes positivos. Los análisis bioinformáticos mostraron una regulación al alza de MAP2K6, CBL, RUNX3, STAT1 y JAK2 en pacientes con COVID-19 en comparación con los pacientes

negativos. Se observó una correlación positiva entre STAT1 y JAK2, la cual varió en paralelo con la carga viral de los pacientes. La expresión de MX1, MX2, ISG15 y OAS1 (cuatro genes estimulados por interferón, ISG, ampliamente conocidos) también se encontró aumentada en pacientes COVID-19 positivos frente a negativos. Los análisis integrativos evidenciaron niveles más elevados de ISG, asociados a una mayor carga viral y a una mayor expresión de STAT1/JAK2. La confirmación de la sobreexpresión de ISG se realizó *in vitro* utilizando la línea celular pulmonar A549 tratada con Poly (I:C), un análogo sintético de ARN viral de doble cadena; así como en diferentes líneas celulares pulmonares humanas y en biopsias traqueales de hurón infectadas con SARS-CoV-2. Un modelo murino preclínico de infección por coronavirus confirmó estos hallazgos, mostrando un aumento de ISG en hígado y pulmones de ratones infectados. En conjunto, estos resultados demuestran el papel del IFN- γ y de los ISG en la respuesta a la infección por SARS-CoV-2, destacando blancos terapéuticos alternativos y potencialmente modulables que podrían potenciar la respuesta del hospedador.

5.2.6.3 Farmacocinética, patología y eficacia de los inhibidores de la proteasa principal de SARS-CoV-2 VPC285785 y VPC285786 en un modelo murino de infección por coronavirus (aceptado en Scientific Reports, enero 2026). Desarrollo de nuevos inhibidores tipo 3-quimotripsina de la proteasa principal de SARS-CoV-2 (Mpro). Los compuestos desarrollados VPC285785 y VPC285786 demostraron una inhibición moderada de Mpro (IC₅₀ de 0,8 μ M frente a 0,03 μ M para Nirmatrelvir, mientras que VPC285786 fue además capaz de inhibir la catepsina L humana (CatL, 4,2 μ M frente a >100 μ M para Nirmatrelvir). Los estudios de estabilidad metabólica *in vitro* en microsomas humanos y murinos revelaron que VPC285786 presentó una estabilidad mejorada en comparación con Nirmatrelvir, con un recambio mínimo observado durante la ventana experimental. El análisis posterior por espectrometría de masas identificó productos metabólicos putativos compatibles con patrones de oxidación previamente descritos. Los estudios farmacocinéticos en ratones demostraron que VPC285785 alcanza una biodisponibilidad oral del 15%, lo que lo hace adecuado para la administración oral, mientras que VPC285786 mostró una exposición oral limitada a pesar de su mayor estabilidad metabólica. Un estudio comparativo de eficacia entre VPC285785 y Nirmatrelvir en un modelo de infección por virus de la hepatitis murina demostró que VPC285785 redujo significativamente la carga viral en hígado, cerebro y bazo en comparación con los controles con vehículo y con Nirmatrelvir, manteniendo al mismo

tiempo parámetros saludables de función hepática. En conjunto, estos resultados sientan las bases para el desarrollo ulterior de antivirales efectivos de la serie VPC285785, que podrían potencialmente utilizarse como fármacos orales de agente único para la infección por SARS-CoV-2, particularmente en virtud de su mecanismo de doble diana y su perfil de toxicidad favorable.

5.2.6.4 PROYECTO: Desarrollo preclínico de un aerosol basado en nanotecnología con Tocilizumab para combatir la COVID-19, Fiocruz- Institut Pasteur de Montevideo - USP (Crispo M., Arevalo AP, Pórfido J; Resumen reporte final 2024). La COVID-19 grave se caracteriza por una respuesta hiperinflamatoria sistémica, en la que la señalización mediada por IL-6 desempeña un rol central en el daño pulmonar. Tocilizumab (TCZ), un anticuerpo monoclonal bloqueador del receptor de IL-6, ha mostrado beneficios clínicos en pacientes con COVID-19 severa; sin embargo, su administración sistémica presenta limitaciones en términos de biodisponibilidad pulmonar y efectos adversos. En este estudio se desarrolló y evaluó un sistema de administración inhalatoria de TCZ empleando nanopartículas como medio de vehiculización (NP-TCZ), con el objetivo de mejorar la entrega local del fármaco al pulmón y reducir la exposición sistémica. Se evaluó la biodistribución pulmonar in vivo de nanopartículas fluorescentes (NP-FitC) administradas por vía intratraqueal en ratones BALB/cJ, observándose una retención pulmonar efectiva durante al menos 72 horas, con aclaramiento progresivo al día 7. Posteriormente, se analizó la eficacia terapéutica de NP-TCZ en un modelo murino de infección por coronavirus utilizando el virus de la hepatitis murina (MHV-A59). Los animales fueron infectados por vía intranasal y tratados mediante insuflación intratraqueal con NP-TCZ, TCZ libre o vehículo. Se evaluaron parámetros clínicos, bioquímica sérica, hematología, histopatología y carga viral mediante qPCR. Los resultados indicaron que el sistema NP es seguro y bien tolerado, sin evidencia de toxicidad sistémica relevante. No obstante, bajo las condiciones experimentales empleadas, el tratamiento con TCZ, tanto encapsulado como libre, no produjo una reducción significativa de la carga viral ni mejoras clínicas sustanciales en comparación con los controles infectados no tratados. En conjunto, este estudio demuestra la viabilidad y seguridad de un sistema de liberación pulmonar basado en estas nanopartículas, aunque sugiere que la eficacia terapéutica del TCZ inhalado requiere una optimización adicional del esquema de administración y/o el uso de modelos de infección más severos. Estos resultados sientan las bases para futuros desarrollos de terapias

inhalatorias dirigidas a modular la respuesta inflamatoria en infecciones respiratorias virales graves.

5.2.6.5 Investigating surface adsorption of Tocilizumab on polymer nanoparticles: a comprehensive biophysical analysis for efficient lung delivery (en preparación). Da Silva PM., Dourado Oliveira D., Prunache IB., Bassam Galal N., Mitsutake H., Silva Medeiros T., Tavares Silva PE., Pinto de Oliveira CL., Kain Kirkensgaard JJ., de Souza Rebouças J., Itri R., Kapishnikov S., **Arevalo AP.**, Crispo M., Nunes Bordallo H., Rocha Formiga F.

5.2.6.6 Exploring IFN- γ yin-yang in Coronavirus defense (en preparación). A Sabater, **AP Arevalo**, P Perbolianachis, J Rada, G Pascual, R Seniuk, JL Porfido, P Sanchis, P Moreno, MP Valacco, G Moratorio, M Crispo, G Gueron, A Toro.

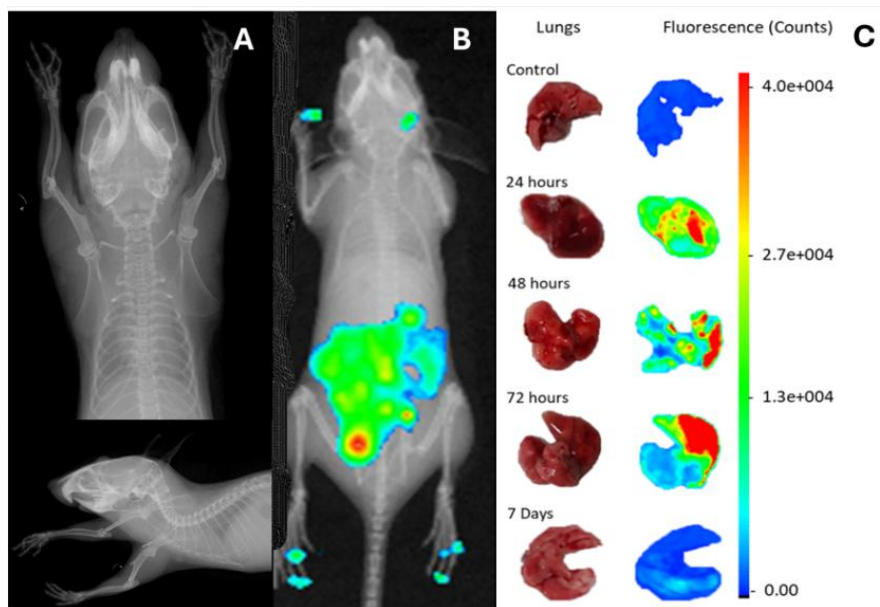


Fig. 3 – Uso de herramientas de imagenología para estudios *in vivo* y *ex vivo* (imágenes representativas). A) Evaluación exploratoria mediante radiografía de patrones pulmonares compatibles con neumonía en el modelo de infección por MHV. B) Patrón bioluminiscente de dispersión viral *in vivo* de MAYVnluc. C) Biodistribución pulmonar de nanopartículas NP-BSA-FitC evaluada mediante técnicas de fluorescencia. Equipo Xtreme II, Bruker.

5.3 MAYV

<https://www.biorxiv.org/content/10.64898/2026.01.04.693264v3>



Systemic dissemination, reproductive tissue tropism and gestational stage-dependent placental responses during Mayaro virus infection in a murine model

✉ A.P.Arévalo, ✉ P.Perbolianachis, ✉ J.L.Pórfido, ✉ M.Pereira-Gómez, ✉ G.Greif, ✉ J.Hurtado, ✉ A.Fajardo, ✉ B.Varela, ✉ J.M.Verdes, ✉ G.Moratorio, ✉ M.Crispo

doi: <https://doi.org/10.64898/2026.01.04.693264>

5.3.1 Tropismo viral y parámetros fisiopatológicos asociados

La infección experimental por MAYV en el modelo murino BALB/cJ se caracterizó por una diseminación sistémica temprana durante la fase aguda, con detección de partículas virales infecciosas en múltiples tejidos somáticos, linfoides y reproductivos dentro de las primeras 24–48 horas post-infección según se reporta en Arévalo et al., 2025 (78). Este amplio tropismo viral se acompañó de alteraciones hematológicas y bioquímicas compatibles con una respuesta fisiopatológica sistémica a la infección viral, incluyendo leucopenia, linfopenia, neutrofilia, trombocitopenia y cambios transitorios en parámetros hepáticos y renales. En conjunto, estos hallazgos describen el establecimiento de una infección sistémica aguda y aportan una caracterización integral del perfil fisiopatológico asociado a la infección por MAYV en este modelo experimental.

5.3.2 Transmisión vertical de MAYV dependiente del estadio gestacional

La infección por MAYV durante la gestación evidenció que el estadio gestacional constituye un determinante clave de la permisividad placentaria y de la exposición fetal al virus. La infección en etapas tempranas de la gestación se asoció con una mayor diseminación viral hacia la unidad materno-fetal, mientras que en estadios gestacionales intermedios la placenta mostró un perfil más restrictivo. En este contexto, la infección asociada a la gestación indujo alteraciones en la dinámica leucocitaria materna compatibles con una respuesta sistémica a la infección viral, sin evidencias de colapso hematológico global. La presencia de antígenos virales en placenta y tejidos fetales fue confirmada mediante inmunohistoquímica en el segundo tercio de la gestación, corroborando la localización viral en la interfaz materno-fetal. Asimismo, el análisis transcriptómico reveló respuestas placentarias dependientes del estadio gestacional, con perfiles diferenciales de expresión génica asociados a inflamación y respuesta antiviral,

lo que refleja una modulación temporal de la respuesta placentaria frente a la infección por MAYV.

5.3.3 Tropismo por tejidos reproductivos y detección de MAYV en esperma.

El estudio de transmisión sexual de MAYV en el modelo murino evidenció un marcado tropismo por tejidos reproductivos durante la infección aguda. En animales infectados, se detectaron partículas virales infecciosas en órganos reproductivos (testículos, ovarios y útero). Asimismo, la detección de partículas virales infecciosas y ARN viral en muestras de esperma, particularmente tras amplificación en cultivo celular, aporta evidencia compatible con la posibilidad de transmisión sexual. En contraste, la detección viral en animales expuestos fue limitada y de baja carga, lo que sugiere que, de ocurrir, la transmisión sexual podría involucrar eventos de baja eficiencia. En conjunto, estos resultados describen un escenario biológicamente plausible de transmisión sexual de MAYV, en concordancia con el tropismo reproductivo observado en el modelo murino.

5.3.4 Imagenología *in vivo*: diseminación rápida y persistencia musculoesquelética de MAYV

El análisis mediante técnicas de imagenología *in vivo* permitió evaluar de manera longitudinal la dinámica de la infección por MAYV-nLuc en el modelo murino. La bioluminiscencia reveló una diseminación viral temprana, detectable desde las primeras 24 horas post-infección, seguida de una persistencia de la señal principalmente en tejidos musculoesqueléticos durante la fase aguda y temprana de recuperación. La señal lumínica se concentró progresivamente en extremidades y tejidos periféricos, mientras que disminuyó en regiones viscerales a tiempos posteriores. Estos hallazgos describen la cinética espacial y temporal de la infección por MAYV *in vivo* y complementan los resultados obtenidos mediante ensayos virológicos convencionales, confirmando el tropismo musculoesquelético del virus en este modelo experimental.

Discusión

La caracterización del tropismo tisular y de la dinámica de diseminación de MAYV resulta clave para avanzar en la comprensión de la patogénesis de este arbovirus emergente y para consolidar el uso de modelos murinos como plataformas experimentales robustas. La detección temprana de virus en bazo y otros órganos durante la fase aguda es consistente con el rol central del sistema linfóide en la infección sistémica y con

observaciones previas en modelos murinos de Alphavirus (79). Asimismo, la presencia viral en músculo se interpreta en concordancia con las manifestaciones musculoesqueléticas características de la enfermedad y con el daño hepático reflejado por elevaciones de ALT y AST, en línea con reportes previos en modelos experimentales y en humanos (43,80,81). Las alteraciones hematológicas observadas se alinean con patrones descritos para enfermedad viral sistémica y refuerzan la relevancia traslacional del modelo para el estudio de MAYV (51,82,83).

En relación con posibles rutas de transmisión no vectoriales, la detección de virus en tejidos reproductivos y su evaluación en muestras de espermatozoides aportan evidencia compatible con una posible transmisión sexual; no obstante, se impone una interpretación cauta y la necesidad de estudios adicionales para determinar la eficiencia y relevancia epidemiológica de esta vía (43,84). En el contexto de la transmisión vertical, el estadio gestacional emerge como un determinante crítico de la permisividad placentaria y de la exposición fetal. La presencia viral durante etapas tempranas de la gestación sugiere la capacidad de MAYV de atravesar la barrera materno-fetal durante la infección aguda (85,86), mientras que en la gestación media se describe un escenario comparativamente más restrictivo para el compartimento fetal (87,88). Estos hallazgos se complementan con el análisis transcriptómico placentario, que revela respuestas dependientes del estadio gestacional, con predominio de firmas antivirales e inducidas por interferón, apoyando la existencia de ventanas temporales de vulnerabilidad biológica durante la gestación (86,89,90).

Finalmente, el uso de MAYV-nLuc para estudios de imagenología *in vivo* permite visualizar la diseminación temprana del virus y la persistencia de señal en tejidos musculoesqueléticos. Esta aproximación habilita el seguimiento longitudinal de la infección en tiempo real y constituye una herramienta relevante para estudios preclínicos, reforzando además la asociación entre el tropismo musculoesquelético observado en el modelo murino y las manifestaciones clínicas de artralgia prolongada descritas en humanos (43,51,91,92).

6-CONCLUSIÓN GENERAL

La presente tesis consolidó el desarrollo y la validación de dos modelos murinos robustos bien caracterizados para el estudio de dos virus zoonóticos emergentes de relevancia en salud pública, integrando aproximaciones virológicas, fisiopatológicas, hematológicas, de transcriptómica y de imagenología *in vivo*. A través de estos modelos fue posible abordar, desde una perspectiva experimental controlada, tanto los mecanismos de infección y diseminación viral como la evaluación preclínica de estrategias terapéuticas basadas en el reposicionamiento farmacológico.

En el modelo murino de infección por MHV, el estudio con administración de una dosis única de ivermectina demostró que reduce la carga viral hepática de los ratones infectados y mejora el estado general de salud. En cuanto a la administración de hemina, no generó alteraciones macroscópicas o histopatológicas evidentes ni cambios significativos en la mayoría de los parámetros bioquímicos evaluados, sí se observó un aumento consistente de la carga de ARN viral en múltiples órganos, así como en plasma y en fracciones enriquecidas de eritrocitos. Estos hallazgos sugieren que el hemo podría facilitar procesos asociados a la infectividad viral y a la circulación del virus en compartimentos sanguíneos, contribuyendo potencialmente a una mayor diseminación sistémica. Por otra parte, la administración de cloroquina mostró la capacidad de contrarrestar parcialmente los efectos provirales inducidos por la hemina. Si bien la cloroquina administrada de forma aislada no produjo mejoras clínicas o histopatológicas relevantes, su combinación con hemina redujo la carga viral en diversos órganos, mejoró la integridad tisular y atenuó la respuesta inflamatoria. Asimismo, el tratamiento combinado contribuyó a la normalización parcial de las alteraciones hematológicas asociadas a la infección, particularmente la linfopenia, la neutrofilia y el índice neutrófilos/linfocitos, además de disminuir la presencia de virus en sangre. Este hallazgo tiene implicancias significativas para las alteraciones hematológicas observadas en pacientes con COVID-19, donde los parámetros sanguíneos podrían desempeñar un papel clave en el desarrollo de tratamientos.

Por su parte, el establecimiento del modelo murino de infección por virus Mayaro (MAYV) permitió una caracterización integral de su tropismo tisular y de las alteraciones fisiopatológicas asociadas a la infección aguda, confirmando una diseminación sistémica temprana con compromiso de tejidos somáticos, musculoesqueléticos y reproductivos. Asimismo, los estudios en hembras gestantes demostraron que el momento gestacional constituye un determinante crítico de la permisividad placentaria y de la exposición fetal,

identificando ventanas temporales de mayor vulnerabilidad durante la infección aguda. La detección de virus infeccioso en tejidos reproductivos y en muestras de espermatozoides aportó, además, evidencia compatible con la posibilidad de transmisión sexual, aunque de baja eficiencia, ampliando el marco conceptual sobre las vías no vectoriales de transmisión de MAYV. El uso de un virus reportero bioluminiscente permitió complementar estos hallazgos mediante el seguimiento longitudinal *in vivo* de la infección, confirmando la persistencia viral en tejidos musculoesqueléticos.

Este enfoque integrado no solo amplía la comprensión de los mecanismos que subyacen a la infección y transmisión de virus emergentes, sino que subraya la importancia de disponer de modelos *in vivo* bien caracterizados, capaces de capturar la complejidad de las interacciones huésped-patógeno. La disponibilidad de estos modelos resulta clave para el avance de la investigación preclínica, al permitir la identificación de blancos terapéuticos, la evaluación de estrategias antivirales y preventivas y la generación de conocimiento con proyección traslacional.

En conjunto, los estudios desarrollados en el marco de esta tesis dieron lugar a la publicación de tres artículos científicos de primera autoría, seis trabajos adicionales en colaboración con grupos nacionales e internacionales, así como a la presentación de resultados en formato oral y póster en eventos científicos nacionales y regionales, reflejando el impacto académico y la relevancia regional de las plataformas experimentales generadas y su aplicación en la investigación biomédica. En este sentido, los modelos y enfoques desarrollados constituyen una base experimental sólida y versátil para futuras investigaciones orientadas a la evaluación preclínica de antivirales, el análisis de rutas de transmisión convencionales y no convencionales, y el fortalecimiento de la capacidad científica y sanitaria para anticipar, comprender y responder a escenarios emergentes en salud pública.

7-PERSPECTIVAS

7.1 Evaluación preclínica de terapias antivirales e inmunomoduladoras

- Utilizar el modelo murino de MHV como plataforma de screening preclínico
- Evaluar nuevas combinaciones farmacológicas basadas en reposicionamiento de drogas
- Profundizar en el eje hemo–virus en infecciones por coronavirus

7.2 Profundizar en los mecanismos de transmisión no vectorial de MAYV

- Caracterizar con mayor detalle: transmisión vertical, transmisión sexual.
- Analizar la persistencia viral en tejidos reproductivos
- Evaluar el impacto de la infección durante distintos estadios gestacionales

7.3 Estudios mecanísticos de patogénesis de MAYV:

- Analizar las respuestas inmunológicas del hospedador durante la infección
- Profundizar en los mecanismos de persistencia musculoesquelética.
- Integrar análisis transcriptómicos para estudiar la respuesta placentaria y sistémica en la preñez
- Evaluar descendencia de ratones infectados durante la preñez

7.4 Desarrollo de modelos experimentales para virus emergentes

- Expandir el uso de los biomodelos desarrollados para el estudio de otros virus zoonóticos emergentes
- Integrar aproximaciones virológicas, inmunológicas y fisiopatológicas
- Consolidar los modelos murinos como plataformas accesibles en condiciones BSL-2

8-PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

8.1 ARTÍCULOS

8.1.1 PUBLICADOS PRIMERA AUTORÍA

- 1) **Systemic dissemination, reproductive tissue tropism and gestational stage-dependent placental responses during Mayaro virus infection in a murine model.** A.P. Arévalo, P. Perbolianachis, J.L. Pórfido, M. Pereira-Gómez, G. Greif, J. Hurtado, A. Fajardo, B. Varela, J.M. Verdes, G. Moratorio, M. Crispo. **BIORXIV.PREPRINT**

<https://www.biorxiv.org/content/10.64898/2026.01.04.693264v3>

- 2) **Blood matters: the hematological signatures of Coronavirus infection.**

A Toro*, AP Arevalo*, M Pereira-Gómez*, A Sabater, EA Zizzi, P Perbolianachis, G Pascual, S Lage-Vickers, JL Porfido, I Achinelli, R Seniuk, J Bizzotto, P Sanchis, A Olivera, A Leiva, P Moreno, A Costabile, A Fajardo, F Carrión, M Fló, N Olivero-Deibe, F Rodriguez, N Nin, N Anselmino, E Labanca, E Vazquez, J Cotignola, DF Alonso, MP Valacco, M Martí, F Gentile, A Cherkasov, M Crispo, G Moratorio, G Gueron. Cell Death and Disease. *Primera autoría compartida. <https://www.nature.com/articles/s41419-024-07247-8>

- 3) **Ivermectin reduces in vivo coronavirus infection in a mouse experimental model.** Arévalo, A, Pagotto, R, Pórfido Barayoli, J, Daghero Villanueva, H,

Segovia, M, Yamasaki, K, Varela Cruces, M, Hill, M, Verdes García, J, Duhalde Vega, M, Bollati-Fogolín, M y Crispo, M. Ivermectin reduces in vivo coronavirus infection in a mouse experimental model. Scientific Reports. [en línea] 2021, 11(7132), 1-12. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86679-0>

8.1.2 PUBLICADO EN COLABORACIÓN

- 1) **Pin-pointing the key hubs in the IFN- γ pathway responding to SARS-CoV-2 infection.** Ayelen Toro*, S Lage-Vickers, J Bizzotto, F Vilicich, A Sabater, G

Pascual, Sabrina Ledesma-Bazan, P Sanchis, MS Ruiz, AP Arevalo, JL Porfido, M Abbate, R Seniuk, E Labanca, N Anselmino, NM Navone, DF Alonso, E Vazquez, M Crispo, J Cotignola, G Gueron*. Viruses. *autora co-corresponsal. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/10/2180>

- 2) **PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β -coronavirus disease.** Maite Duhalde Vega, Daniela Olivera Gustavo Gastão Davanzo, Mauricio Bertullo, Verónica Noya, Gabriela Fabiano de Souza, Stéfanie Primon Muraro, Icaro Castro, **Ana Paula Arévalo**, Martina Crispo, Germán Galliussi, Sofia Russo, David Charbonnier, Florencia Rammauro, Mathías Jeldres, Catalina Alamón, Valentina Varela, Carlos Batthyany, Mariela Bollati-Fogolín, Pablo Opezzo, Otto Pritsch, José Luiz Proença-Módena, Helder I Nakaya, Emiliano Trias, Luis Barbeito, Ignacio Anegón, María Cristina Cuturi, Pedro Moraes-Vieira, Mercedes Segovia, Marcelo Hill. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abn6545>

- 3) **Pharmacokinetics, Pathology and Efficacy of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors VPC285785 and VPC285786 in a Murine Model of Coronavirus Infection.** Jason R Smith*, Ayelen Toro*, Agustina Sabater, Suzana Kovacic, Fuqiang Ban, **Ana P Arevalo**, Martina Crispo, Geraldine Gueron, Robert N Young, Artem Cherkasov. SciRep. <https://www.nature.com/articles/s41598-026-36842-2>

8.1.3 EN REDACCION

- 1) **Exploring IFN- γ yin-yang in Coronavirus defense.** A Sabater, **AP Arevalo**, P Perbolianachis, J Rada, G Pascual, R Seniuk, JL Porfido, P Sanchis, P Moreno, MP Valacco, G Moratorio, M Crispo, G Gueron, A Toro.

- 2) **Investigating surface adsorption of Tocilizumab on polymer nanoparticles: a comprehensive biophysical analysis for efficient lung delivery** (en preparación). Da Silva PM., Dourado Oliveira D., Prunache IB., Bassam Galal N., Mitsutake H., Silva Medeiros T., Tavares Silva PE., Pinto de Oliveira CL., Kain Kirkensgaard JJ., de Souza Rebouças J., Itri R., Kapishnikov S., Arevalo AP., Crispo M., Nunes Bordallo H., Rocha Formiga F.

8.2 PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

- 1) **Virus Mayaro: modelo murino y evidencia de tropismo reproductivo y fetal.** A.P. Arévalo, P. Perbolianachis, JL. Pórfido, M. Pereira-Gómez, B. Varela, JM. Verdes, G. Moratorio, M. Crispo. III Encuentro Uruguayo de Virología, 1 y 2 de diciembre de 2025. Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República. Salto, Uruguay. Premio mejor póster en el área: “De la investigación a la aplicación: biotecnología y desarrollo de plataformas moleculares”.
- 2) **Blood matters: hematological signatures of coronavirus infection.** A. Toro, A.P. Arévalo, M. Pereira-Gómez, ..., M. Crispo, G. Moratorio, G. Gueron. Poster en las Primeras Jornadas Científicas de Jóvenes Investigadores e Investigadoras del Institut Pasteur de Montevideo, 12 de junio de 2025.
- 3) **Uso de un modelo murino genéticamente modificado para explorar la función de IFN- γ en la defensa frente a la infección por Coronavirus.** Seniuk, R; Sabater, A; Perbolianachis, P; **Arévalo, AP**; Capolicchio, V; Bailez, D; Achinelli, I; Pascual, G; Sanchis, P; Pereira-Gómez, M; Porfido, J; Crispo, M; Moratorio, G; Gueron, G; Carballeda, J; Toro, A. REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE VIROLOGIA 2024. La Plata, Buenos Aires, Argentina, 4-6 de noviembre de 2024
- 4) **Balancing immune forces: exploring IFN- γ yin-yang in coronavirus defense.** Agustina Sabater, Juan Bizzotto, Gaston Pascual, **Ana P. Arévalo**, Marianoel Pereira-Gómez, Jorge L. Porfido, Rocio Seniuk, Inés Achinelli, Pablo Sanchis, Sofía Lage-Vickers, Elba Vazquez, Javier Cotignola, Gonzalo Moratorio, Martina Crispo, Geraldine Gueron, Ayelen Toro. TRABAJO FINALISTA PREMIO CHERNY. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica 2023. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 15-17 de noviembre de 2023
- 5) **Coronavirus bloodlust: heme complicity during viral infection.** Ayelén Toro, Agustina Sabater, Gastón Pascual, **Ana Paula Arevalo**, Marianoel Pereira, Inés Achinelli, Rocío Seniuk, Jorge Porfido, Eric Zizzi, Alvaro Olivera, Francesco Gentile, Artem Cherkasov, Gonzalo Moratorio, Martina Crispo, Geraldine Gueron. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación

Clínica 2023. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 15-17 de noviembre de 2023. TRABAJO PREMIADO POR LA FUNDACIÓN HONORIO BIGAND.

- 6) **Red blood cells may be critical for coronavirus to orchestrate a multiorgan conquer.** Ayelén Toro, **Ana Paula Arevalo**, Gastón Pascual, Agustina Sabater, Marianoel Pereira, Jorge Porfido, Sofia Lage-Vickers, Juan Bizzotto, Pablo Sanchis, Elba Vázquez, Javier Cotignola, Gonzalo Moratorio, Martina Crispo, and Geraldine Gueron. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica 2022. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 17-19 de noviembre de 2022. TRABAJO FINALISTA PREMIO BIGAND.

- 7) **Old drugs, novel uses: combination of ivermectin and hemin as a promising treatment against SARS-CoV-2 infection.** Minotti A, Sanchis P, Lage-Vickers S, Pascual G, Seniuk R, Vazquez E, Cotignola J, **Arevalo A**, Crispo M, Gueron G, Toro, A. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica 2021. (modalidad virtual).

9-BIBLIOGRAFÍA

1. Torres Munguía JA, Badarau FC, Díaz Pavez LR, Martínez-Zarzoso I, Wacker KM. A global dataset of pandemic- and epidemic-prone disease outbreaks. *Scientific Data* 2022 9:1 [Internet]. 2022 Nov 10 [cited 2026 Jan 8];9(1):683-. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41597-022-01797-2>
2. La OMS advierte que el coronavirus, ahora denominado COVID-19, es el “enemigo público número 1” y potencialmente más poderoso que el terrorismo - ABC News [Internet]. [cited 2026 Jan 13]. Available from: <https://www.abc.net.au/news/2020-02-12/coronavirus-public-enemy-number-one-vaccine/11956446>
3. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis* [Internet]. 2020 [cited 2026 Jan 8];91(1):157. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7569573/>
4. Nossier ES, Anwar MM, El-Zahabi MA. Recent advances in drug repositioning and rediscovery for different therapeutic activities utilizing updated technological approaches. *Molecular Diversity* 2025 [Internet]. 2025 Jul 4 [cited 2026 Jan 13];1–28. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11030-025-11248-w>
5. Alerta epidemiológica Chikungunya y Oropouche en la Región de las Américas - 28 de agosto del 2025 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2026 Jan 8]. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-chikungunya-oropouche-region-americas-28-agosto-2025>
6. ARBO Boletines - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2026 Jan 8]. Available from: <https://www.paho.org/es/arbo-portal/arbo-boletines>
7. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Fiebre de Mayaro. 1 de mayo de 2019, Washington, D.C.: OPS/OMS;2019 [Internet]. Available from: www.paho.org
8. Chang MCJ, Grieder FB. The continued importance of animals in biomedical research. *Lab Animal* 2024 53:11 [Internet]. 2024 Oct 14 [cited 2026 Jan 8];53(11):295–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41684-024-01458-4>

9. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. *Adv Virus Res* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2026 Jan 8];81:85–164. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/bookseries/pii/B9780123858856000092?via%3Dihub>
10. Timani KA, Liao Q, Ye L, Zeng Y, Liu J, Zheng Y, et al. Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2026 Jan 8];114(1–2):23–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170205001668?via%3Dihub>
11. Wulan WN, Heydet D, Walker EJ, Gahan ME, Ghildyal R. Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped RNA viruses. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Jun 2 [cited 2026 Jan 8];6(JUN):139969. Available from: www.frontiersin.org
12. Körner RW, Majjouti M, Alejandre Alcazar MA, Mahabir E. Of mice and men: The coronavirus mhc and mouse models as a translational approach to understand sars-cov-2. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020.
13. Grabherr S, Ludewig B, Pikor NB. Insights into coronavirus immunity taught by the murine coronavirus. *Eur J Immunol*. 2021 May 1;51(5):1062–70.
14. Crump A, Omura S. Ivermectin, ‘Wonder drug’ from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2011 Feb 10;87(2):13–28.
15. Ashraf S, Chaudhry U, Raza A, Ghosh D, Zhao X. In vitro activity of ivermectin against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2018 7:1 [Internet]. 2018 Feb 20 [cited 2026 Jan 8];7(1):27–. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13756-018-0314-4>
16. Crump A. Ivermectin: enigmatic multifaceted ‘wonder’ drug continues to surprise and exceed expectations. *The Journal of Antibiotics* 2017 70:5 [Internet]. 2017 Feb 15 [cited 2026 Jan 8];70(5):495–505. Available from: <https://www.nature.com/articles/ja201711>

17. Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Medina-Franco JL, Saldivar-Gonzalez F, Flores-Torrontegui Y, Juarez M, et al. Ivermectin as an inhibitor of cancer stem-like cells. *Mol Med Rep* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2026 Jan 8];17(2):3397–403. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.8231/abstract>
18. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochemical Journal* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2026 Jan 8];443(3):851–6. Available from: </biochemj/article/443/3/851/80615/Ivermectin-is-a-specific-inhibitor-of-importin>
19. Heidary F, Gharebaghi R. Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. *The Journal of Antibiotics* 2020 73:9 [Internet]. 2020 Jun 12 [cited 2026 Jan 8];73(9):593–602. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41429-020-0336-z>
20. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2026 Jan 8];178:104787. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354220302011?via%3Di> hub
21. Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, Kushner JP, Pierach CA, Pimstone NR, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann Intern Med* [Internet]. 2005 Mar 15 [cited 2026 Jan 8];142(6):439–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15767622/>
22. Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2026 Jan 8];122(3):93–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21992109/>
23. Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* [Internet]. 2008 Jan [cited 2026 Jan 8];117(2):231–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18195184/>

24. El Kalamouni C, Frumence E, Bos S, Turpin J, Nativel B, Harrabi W, et al. Subversion of the Heme Oxygenase-1 Antiviral Activity by Zika Virus. *Viruses* 2019, Vol 11, Page 2 [Internet]. 2018 Dec 20 [cited 2026 Jan 8];11(1):2. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/1/2/htm>
25. Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, Sass G, Svorcova M, Webb D, et al. Antiviral Activity and Hepatoprotection by Heme Oxygenase-1 in Hepatitis B Virus Infection. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 [cited 2026 Jan 8];133(4):1156–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17919491/>
26. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 [cited 2026 Jan 8];2(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22474613/>
27. Zhang A, Wan B, Jiang D, Wu Y, Ji P, Du Y, et al. The Cytoprotective Enzyme Heme Oxygenase-1 Suppresses Pseudorabies Virus Replication in vitro. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Mar 13 [cited 2026 Jan 8];11:520951. Available from: www.frontiersin.org
28. Toro A, Ruiz MS, Lage-Vickers S, Sanchis P, Sabater A, Pascual G, et al. A Journey into the Clinical Relevance of Heme Oxygenase 1 for Human Inflammatory Disease and Viral Clearance: Why Does It Matter on the COVID-19 Scene? *Antioxidants* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2026 Jan 8];11(2):276. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8868141/>
29. Kim DH, Ahn HS, Go HJ, Kim DY, Kim JH, Lee JB, et al. Hemin as a novel candidate for treating COVID-19 via heme oxygenase-1 induction. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 2021 Nov 2 [cited 2026 Jan 8];11(1):21462-. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01054-3>
30. Pimentel J, Andersson N. Chloroquine and its derivatives in the management of COVID-19: A scoping review. *Biomédica* [Internet]. 2020 [cited 2026 Jan 13];40(Suppl 2):80. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7676841/>
31. Yao X, Ye F, Zhang M, Cui C, Huang B, Niu P, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

- Clin Infect Dis [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2026 Jan 13];71(15):732–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150618/>
32. Orth HM, Pfau S, Gabriel M, Günther S, Tappe D, Hornuss D, et al. A cluster of Mayaro virus infections in a film team returning from Suriname, February 2024. *Euro Surveill*. 2024 Oct 1;29(44).
 33. Blohm G, Elbadry MA, Mavian C, Stephenson C, Loeb J, White S, et al. Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. *International Journal of Infectious Diseases*. 2019 Oct 1;87:151–3.
 34. Ganjian N, Riviere-Cinnamond A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*;44, feb 2020 [Internet]. 2020 [cited 2025 Oct 20];44. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51857>
 35. Valencia-Marín BS, Gandica ID, Aguirre-Obando OA. The Mayaro virus and its potential epidemiological consequences in Colombia: An exploratory biomathematics analysis. *Parasit Vectors*. 2020 Oct 8;13(1).
 36. Caicedo EY, Charniga K, Rueda A, Dorigatti I, Mendez Y, Hamlet A, et al. The epidemiology of mayaro virus in the americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Jun 1;15(6).
 37. Celone M, Beeman S, Han BA, Potter AM, Pecor DB, Okech B, et al. Understanding transmission risk and predicting environmental suitability for Mayaro Virus in Central and South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024 Jan 1;18(1).
 38. García-Romero C, Carrillo Bilbao GA, Navarro JC, Martín-Solano S, Saegerman C. Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine. Vol. 15, *Viruses*. MDPI; 2023.
 39. Dieme C, Ciota AT, Kramer LD. Transmission potential of Mayaro virus by *Aedes albopictus*, and *Anopheles quadrimaculatus* from the USA. *Parasit Vectors*. 2020 Dec 1;13(1).

40. Navarro MM, Revisión JC, Tema DE, Muñoz M, Navarro JC. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. Vol. 32, Biomédica. 2012.
41. Ganjian N, Riviere-Cinnamond A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*. 2020;44.
42. Andreolla AP, Borges AA, Bordignon J, Duarte dos Santos CN. Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
43. Diagne CT, Bengue M, Choumet V, Hamel R, Pompon J, Missé D. Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. Vol. 9, *Pathogens*. MDPI AG; 2020. p. 1–23.
44. Marinho M dos S, Ferreira GM, Grosche VR, Nicolau-Junior N, Campos T de L, Santos IA, et al. Evolutionary Profile of Mayaro Virus in the Americas: An Update into Genome Variability. *Viruses*. 2024 May 1;16(5).
45. Cereghino C, Roesch F, Carrau L, Hardy A, Ribeiro-Filho H V., Henrion-Lacritick A, et al. The E2 glycoprotein holds key residues for Mayaro virus adaptation to the urban *Aedes aegypti* mosquito. *PLoS Pathog* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 Oct 22];19(4):e1010491. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10109513/>
46. Ribeiro-Filho H V., Coimbra LD, Cassago A, Rocha RPF, Guerra JV da S, de Felicio R, et al. Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
47. Mendonça DC, Reis EVS, Arias NEC, Valencia HJ, Bonjardim CA. A study of the MAYV replication cycle: Correlation between the kinetics of viral multiplication and viral morphogenesis. *Virus Res* [Internet]. 2022 Jan 2 [cited 2025 Oct 21];323:199002. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10194297/>
48. Krovovsky L, Lins CRB, Guedes DRD, Wallau G da L, Ayres CFJ, Paiva MHS. Dynamic of Mayaro Virus Transmission in *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes, and a Mice Model. *Viruses*. 2023 Mar 1;15(3).

49. Pereira TN, Virginio F, Souza JI, Moreira LA. Emergent Arboviruses: A Review About Mayaro virus and Oropouche orthobunyavirus. *Frontiers in Tropical Diseases* [Internet]. 2021 Nov 8 [cited 2025 Oct 21];2:737436. Available from: www.frontiersin.org
50. De Thoisy B, Gardon J, Alba Salas R, Morvan J, Kazanji M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2003 Oct 1;9(10):1326–9.
51. Silva-Ramos CR, Mejorano-Fonseca JA, Hidalgo M, Rodríguez-Morales AJ, Faccini-Martínez AA. Clinical, Epidemiological, and Laboratory Features of Mayaro Virus Infection: a Systematic Review. Vol. 10, *Current Tropical Medicine Reports*. 2023. p. 309–19.
52. de Curcio JS, Salem-Izacc SM, Pereira Neto LM, Nunes EB, Anunciação CE, Silveira-Lacerda E de P. Detection of Mayaro virus in *Aedes aegypti* mosquitoes circulating in Goiânia-Goiás-Brazil. *Microbes Infect*. 2022 Jun 1;24(4).
53. Ganjian N, Riviere-Cinamond A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*. 2020;44.
54. Andreolla AP, Borges AA, Bordignon J, Duarte dos Santos CN. Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
55. Pancetti FGM, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: A rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):87–9.
56. Russell WMS, Burch RL. *Russell and Burch's Principles of Humane Experimental Techniques*. 1992;
57. Arévalo AP, Pagotto R, Pórfido JL, Daghero H, Segovia M, Yamasaki K, et al. Ivermectin reduces in vivo coronavirus infection in a mouse experimental model. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
58. Johansen MD, Irving A, Montagutelli X, Tate MD, Rudloff I, Nold MF, et al. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2026 Jan 8];13(6):877–91. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933021922002562?via%3Dihub>

59. Kosyna FK, Nagel M, Kluxen L, Kraushaar K, Depping R. The importin α/β -specific inhibitor Ivermectin affects HIF-dependent hypoxia response pathways. *Biol Chem* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2026 Jan 8];396(12):1357–67. Available from: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/hsz-2015-0171/html>
60. Jans DA, Wagstaff KM. Ivermectin as a Broad-Spectrum Host-Directed Antiviral: The Real Deal? *Cells* 2020, Vol 9, Page 2100 [Internet]. 2020 Sep 15 [cited 2026 Jan 8];9(9):2100. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/9/2100/htm>
61. Sharun K, Dhama K, Patel SK, Pathak M, Tiwari R, Singh BR, et al. Ivermectin, a new candidate therapeutic against SARS-CoV-2/COVID-19. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2020 19:1 [Internet]. 2020 May 30 [cited 2026 Jan 8];19(1):23-. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12941-020-00368-w>
62. Toro A, Arévalo AP, Pereira-Gómez M, Sabater A, Zizzi EA, Perbolianachis P, et al. Blood matters: the hematological signatures of Coronavirus infection. *Cell Death Dis.* 2024 Nov 1;15(11).
63. Rosa A, Pye VE, Graham C, Muir L, Seow J, Ng KW, et al. SARS-CoV-2 can recruit a heme metabolite to evade antibody immunity. *Sci Adv* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2026 Jan 13];7(22):17. Available from: <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/sciadv.abg7607?download=true>
64. Sahu KK, Borogovac A, Cerny J. COVID-19 related immune hemolysis and thrombocytopenia. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2026 Jan 13];93(2):1164–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32776538/>
65. Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Kaushik A, Kujawska M, Batiha GES. Hemolytic anemia in COVID-19. *Ann Hematol* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2026 Jan 13];101(9):1887–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35802164/>
66. Al-Aly Z, Xie Y, Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature* 2021 594:7862 [Internet]. 2021 Apr 22 [cited 2026

- Jan 13];594(7862):259–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03553-9>
67. Hopp MT, Rathod DC, Imhof D. Host and viral proteins involved in SARS-CoV-2 infection differentially bind heme. *Protein Sci* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2026 Jan 13];31(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36161737/>
 68. Lechuga GC, Souza-Silva F, Sacramento CQ, Trugilho MRO, Valente RH, Napoleão-Pêgo P, et al. SARS-CoV-2 Proteins Bind to Hemoglobin and Its Metabolites. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2026 Jan 13];22(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445741/>
 69. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2026 Jan 13];395(10223):497–506. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S0140673620301835>
 70. Zandi M, Behboudi E, Soltani S. Role of Glycoprotein Hemagglutinin-Esterase in COVID-19 Pathophysiology? *Stem Cell Rev Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2026 Jan 13];17(6):2359–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34181186/>
 71. Kazi L, Lissenberg A, Watson R, de Groot RJ, Weiss SR. Expression of Hemagglutinin Esterase Protein from Recombinant Mouse Hepatitis Virus Enhances Neurovirulence. *J Virol* [Internet]. 2005 Dec 15 [cited 2026 Jan 13];79(24):15064. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1316009/>
 72. Bachhawat K, Thomas CJ, Surolia N, Surolia A. Interaction of chloroquine and its analogues with heme: An isothermal titration calorimetric study. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2000 Oct 5 [cited 2026 Jan 13];276(3):1075–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11027592/>
 73. Oscanoa TJ, Romero-Ortuno R, Carvajal A, Savarino A. A pharmacological perspective of chloroquine in SARS-CoV-2 infection: An old drug for the fight against a new coronavirus? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2026 Jan 13];56(3):106078. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7334645/>

74. Devaux CA, Rolain JM, Colson P, Raoult D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2026 Jan 13];55(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32171740/>
75. Gies V, Bekaddour N, Dieudonné Y, Guffroy A, Frenger Q, Gros F, et al. Beyond Anti-viral Effects of Chloroquine/Hydroxychloroquine. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jul 2 [cited 2026 Jan 13];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32714335/>
76. Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, Giarratano A, Einav S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *J Crit Care* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2026 Jan 13];57:279–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32173110/>
77. Huang M, Li M, Xiao F, Pang P, Liang J, Tang T, et al. Preliminary evidence from a multicenter prospective observational study of the safety and efficacy of chloroquine for the treatment of COVID-19. *Natl Sci Rev* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2026 Jan 13];7(9):1428–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34676087/>
78. Arévalo AP, Perbolianachis P, Pórfido JL, Pereira-Gómez M, Greif G, Hurtado J, et al. Systemic dissemination, reproductive tissue tropism and gestational stage-dependent placental responses during Mayaro virus infection in a murine model [Internet]. 2026. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.64898/2026.01.04.693264>
79. de Carvalho AC, Dias CSB, Coimbra LD, Rocha RPF, Borin A, Fontoura MA, et al. Characterization of Systemic Disease Development and Paw Inflammation in a Susceptible Mouse Model of Mayaro Virus Infection and Validation Using X-ray Synchrotron Microtomography. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 1;24(5).
80. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Rodríguez Y, Pacheco Y, Anaya JM, Ramírez-Santana C. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 Oct 20];7(1):1–11. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1038/s41426-018-0163-5>

81. Santos FM, Dias RS, de Oliveira MD, Costa ICTA, Fernandes L de S, Pessoa CR, et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 May 1;13(5).
82. Mota MT de O, Costa VV, Sugimoto MA, Guimarães G de F, Queiroz-Junior CM, Moreira TP, et al. In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. *Sci Rep [Internet]*. 2020 Dec 1 [cited 2025 Oct 27];10(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-62084-x>
83. de Carvalho AC, Dias CSB, Coimbra LD, Rocha RPF, Borin A, Fontoura MA, et al. Characterization of Systemic Disease Development and Paw Inflammation in a Susceptible Mouse Model of Mayaro Virus Infection and Validation Using X-ray Synchrotron Microtomography. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 1;24(5).
84. Krokovsky L, Lins CRB, Guedes DRD, Wallau G da L, Ayres CFJ, Paiva MHS. Dynamic of Mayaro Virus Transmission in *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes, and a Mice Model. *Viruses*. 2023 Mar 1;15(3).
85. Taylor M, Rayner JO. Immune Response to Chikungunya Virus: Sex as a Biological Variable and Implications for Natural Delivery via the Mosquito. *Viruses [Internet]*. 2023 Sep 1 [cited 2025 Oct 27];15(9):1869. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10538149/>
86. Hcini N, Lambert V, Picone O, Carod JF, Carles G, Pomar L, et al. Arboviruses and pregnancy: are the threats visible or hidden? *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2024 Dec 1;10(1).
87. Atkins GJ, Carter J, Sheahan³ BJ. Effect of Alphavirus Infection on Mouse Embryos. Vol. 38, *INFECTION AND IMMUNITY*. 1982.
88. Vermillion MS, Lei J, Shabi Y, Baxter VK, Crilly NP, McLane M, et al. Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. *Nat Commun*. 2017 Feb 21;8.
89. Megli CJ, Coyne CB. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. Vol. 20, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2022. p. 67–82.

90. Wu Y, Su K, Zhang Y, Liang L, Wang F, Chen S, et al. A spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse placentation. *Cell Discov.* 2024 Dec 1;10(1).
91. Mota MT de O, Costa VV, Sugimoto MA, Guimarães G de F, Queiroz-Junior CM, Moreira TP, et al. In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
92. Santos FM, Dias RS, de Oliveira MD, Costa ICTA, Fernandes L de S, Pessoa CR, et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 May 1;13(5).

10- AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Martina y Gonzalo, por la oportunidad de desarrollo profesional y personal. Por su optimismo, empuje y, principalmente, por no dejarme desistir.

A Martina, por fomentar mi crecimiento en todos los aspectos durante tantos años compartidos.

A Gonzalo gracias totales por estar hasta cuando no debía, y a Abril, que llegó a iluminar.

A Geraldine y Noel, por la vida personal y profesional compartida. A Gabriel, Ismael, Jesús, Merybeth y Judith por estar siempre al pie del cañón, especialmente a Sergio y Andrea. A Tati y Andrés que siempre encuentran la forma de estar.

A Jorge, Paula y Alvaro por las charlas profesionales y de las otras, esas que te hacen la vida más linda.

A todos quienes de una forma u otra colaboraron en el proceso, especialmente a todos los integrantes del LEEV. A Marianoel.

A los investigadores del bioterio, por sus palabras de aliento, sus consejos y siempre estar a disposición y pendientes de esta etapa.

A Ayelén y Geraldine, compañeras de este camino.

A las UBC's, por ser las mejores vecinas y tener siempre la puerta abierta.

A todos aquellos con quienes compartimos el instituto durante la pandemia al comienzo sin certezas, pero con la convicción y las ganas de seguir empujando hacia adelante.

A mis amigos, que definitivamente soportan mucho más que la escritura de otra tesis.

A mi familia: Elisa, Julio, Juan Pablo y Cecilia, por su apoyo incondicional y por acompañarme aun a la distancia con las palabras justas en el momento preciso.

A Felipe, porque con su amor y su mirada me impulsa a ser una mejor persona.

Y a Luis, siempre.