

000033

HURLINGHAM, 10 de junio de 2020

VISTO el Estatuto de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, la Ley 24.521, la Política de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (R.C.S. N° 11/15), el Reglamento de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (R.C.S. N° 08/16, 59/16 y 87/17), el Expediente Nro. 132/2020 de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM y la Resolución Rectoral Nro. 104/20; y,

CONSIDERANDO:

Que la Ley 24.521 de Educación Superior establece en su artículo 28 inc. b) que son funciones básicas de las instituciones universitarias promover y desarrollar la investigación científica.

Que el artículo 81 de Estatuto Universitario establece que la misma asumirá la investigación científica como una de sus funciones sustanciales, en concordancia con lo establecido por la Ley 24.521, y conforme a lo establecido en los órganos de gobierno, teniendo como objetivos principales la producción de conocimiento y la formación de recursos humanos para la investigación.

Que dicha función será abordada a partir de la implementación de planes, programas y proyectos de investigación, de acuerdo al artículo 82 del mencionado estatuto.

Que mediante Resolución N° 11/15 del Consejo Superior se aprobó la Política de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, en donde se propone el desarrollo de un modelo de investigación entendido como construcción de conocimiento colectivo, participativo, interdisciplinario a partir de problemáticas relevantes, pertinentes y oportunas para comprender la realidad social-local, nacional, regional y mundial- y actuar en ella transformándola en un sentido emancipador.

Que mediante Resolución N° 8/16 del Consejo Superior se aprobó el Reglamento de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, luego modificado mediante las Resoluciones N° 59/16 y 87/17.

000033

Que el Artículo 11 del Reglamento de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM incorporado mediante la Resolución N° 59/16, y luego ratificado por la Resolución N° 87/17, prevé el "(...) financiamiento de propuestas de investigación de manera extraordinaria, que resultasen de interés para la Universidad (...). Dichos proyectos presentados de forma extraordinaria fuera de las convocatorias regulares deberán representar un interés particular desde la temática o desarrollo científico tecnológico propuesto, o bien una urgencia estratégica desde su implementación".

Que ante la situación de pandemia generada por el SARS-COV-2, el Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SNCTI) en su conjunto se ha puesto a disposición del Poder Ejecutivo Nacional (PEN) para su mitigación, a través del desarrollo de proyectos de investigación básica y aplicada que presenten soluciones a corto y mediano plazo.

Que la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, como parte del SNCTI, pone a disposición su infraestructura, equipamiento y capital intelectual para el desarrollo de actividades I+D conforme a lo establecido en su Estatuto, en relación a la pertinencia de las mismas a nivel local, regional y nacional.

Que la Secretaría de Investigación pone a consideración el proyecto "Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como antiviral frente a SARS-COV-2", a cargo del docente/investigador Dr. Paulo Maffía.

Que el Secretario Administrativo Financiero y Técnico ha tomado la intervención de su competencia e informa que la UNAHUR cuenta con fondos propios para hacer frente a la propuesta.

Que la Dirección General de Asuntos Legales ha tomado la intervención de su competencia y ha emitido dictamen.-

Que por Resolución Rectoral se aprobó Ad Referéndum del Consejo Superior el proyecto de investigación mencionado ut supra.

Que reunida la comisión de Investigación, Bienestar estudiantil y Servicios a la Comunidad, evalúa lo actuado y emite su dictamen de modo favorable.

Que el Rector lo remite al Consejo Superior para su consideración.

000033

Que la presente medida se toma en uso de las atribuciones conferidas por el Estatuto de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM y el Reglamento Interno del Consejo Superior y luego de haberse resuelto en reunión del día 10 de junio de 2020 de este Consejo Superior.

Por ello,

EL CONSEJO SUPERIOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM

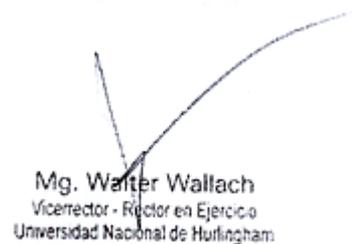
RESUELVE:

ARTÍCULO 1°. – Convalidar la Resolución Rectoral Nro. 104/2020 de fecha 29 de mayo de 2020, que aprueba el proyecto de investigación "Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como antiviral frente a SARS-COV-2", dirigido por el Dr. Paulo Maffía, que como Anexo pasa a formar parte integrante de la presente resolución.

ARTÍCULO 2°. - Comuníquese, regístrese y archívese.

RESOLUCIÓN C.S. N° 000033


Lic. Nicolás Vilela
SECRETARIO GENERAL
Universidad Nacional de Hurlingham


Mg. Walter Wallach
Vicerrector - Rector en Ejercicio
Universidad Nacional de Hurlingham

000033**ANEXO****CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (ART. 11)****PLAN DE TRABAJO****DIRECTOR/A:****Dr. Paulo Maffía****TÍTULO:****Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como
antiviral frente a SARS-COV-2****FUNDAMENTACIÓN:
(hasta 400 palabras)**

Actualmente, no hay medicamentos u otras terapias aprobadas para prevenir o tratar el COVID-19. El tratamiento clínico actual incluye medidas de prevención y control de infecciones y atención de apoyo, incluido oxígeno suplementario y soporte ventilatorio mecánico cuando esté indicado. Una opción terapéutica promisorio recientemente postulada es el tratamiento con dosis altas de vitamina D3 a pacientes críticos de COVID-19 (1). Este tratamiento induce, entre otras cosas, a la expresión del péptido de defensa humano catelicidina LL-37 por macrófagos y células epiteliales (2). La inducción del péptido de defensa LL-37 a través de la administración de VitD3 y/o fenilbutirato ha sido demostrado en varios trabajos. En un ensayo clínico completado y publicado (3) se reportó que la administración de VitD3 junto con 4-phenyl butyrate (PBA) indujeron la expresión de LL-37 en pacientes con tuberculosis activa (dosis usadas: Fenilbutirato de sodio: 500 mg dos veces al día por vía oral durante 2 meses; Colecalciferol: 5000 UI una vez al día por vía oral durante 2 meses). El tratamiento con PBA, vitD3 o la combinación redujo los síntomas clínicos. En línea con una mejora de los resultados primarios, el tratamiento con PBA y vitD3 también dió como resultado una mayor expresión sinérgica de LL-37 en células inmunes concomitante a una mayor muerte intracelular de Mycobacterium tuberculosis en macrófagos ex vivo. En este contexto se torna indispensable para sustentar esta novedosa opción terapéutica en COVID-19, el soporte científico in vitro, de tipo "proof of concept", evaluando una de las moléculas más importantes entre los péptidos de defensa humanos con actividad antiviral que se inducen durante este tratamiento, la catelicidina LL-37. Los resultados hasta aquí obtenidos tanto por nuestro grupo, como por otros investigadores, han demostrado que los péptidos antimicrobianos, tanto los de diseño como los naturales o endógenos, poseen un gran potencial como posibles nuevos fármacos frente a diversos patógenos de la salud humana (4,5,6) Desde hace años nuestro grupo ha venido estudiando diversas secuencias peptídicas derivadas de péptidos de defensa del sistema inmune innato, con actividad frente a patógenos bacterianos (7). En el último año además hemos incorporado una línea de investigación dedicada a la evaluación de péptidos antivirales.

Nuestros resultados previos in vitro con un péptido de diseño y con la catelicidina humana LL-37, realizados en el Instituto de Virología Animal de INTA Castelar, en un flavivirus como el virus de la diarrea viral bovina (BDVB) han sido alentadores, demostrando inhibición de la replicación viral y baja toxicidad. En éstos trabajos previos pudimos comprobar que la incubación con el péptido disminuye significativamente el título viral en un cultivo celular infectado.

000033
OBJETIVO GENERAL:

Demostrar mediante ensayos *in vitro* correctamente diseñados y validados, que la nueva opción terapéutica basada en la inducción del péptido de defensa LL-37 es totalmente viable y promisorio en pacientes con COVID19

En función de los promisorios resultados previos y de la urgencia de nuevas opciones terapéuticas, en caso de demostrar actividad antiviral *in vitro* correctamente validada, significaría un gran paso, ya que sustentaría de manera sólida la opción terapéutica basada en la inducción de éste péptido de defensa o como terapia combinada a las otras en evaluación. Estos resultados brindarían el sustento experimental necesario a los protocolos clínicos de administración de vitaD_3 (como para tuberculosis activa), en donde inducen la expresión de ésta molécula de manera endógena por las propias células epiteliales y/o por macrófagos en pulmón. La vitamina D3 es un suplemento accesible económicamente que podría significar una mejora considerable para los pacientes internados. Paralelamente en este proyecto se propone también **la obtención de forma recombinante del péptido, que incluya su expresión y purificación por protocolos escalables y transferibles a la industria.** Reemplazando así la importación de ésta molécula y generando el *know how* necesario en su producción local. Este objetivo encuentra sustento en la posible administración del péptido LL-37 recombinante de manera aerosolizada a pulmón en un futuro cercano, para aumentar aún más la concentración de ésta molécula y concomitantemente su actividad biológica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. *Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a coronavirus bovino en cultivo in vitro*
2. *Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a SARS COV 2 en cultivo in vitro*
3. *Obtención de la concentración efectiva 50, porcentaje de inhibición del rendimiento viral y efecto citopático en ambas cepas de virus*
4. *Obtención del péptido LL-37 por técnicas de ADN recombinante y purificación*

000033

**MATERIALES Y
MÉTODOS:
(hasta 400 palabras)**

Obtención del péptido LL-37 por síntesis automatizada con pureza mayor a 95%. Para esto se dispondrá la compra del producto purificado y liofilizado a la empresa GenScript USA, quienes pueden sintetizar y enviar el péptido en lapsos de tiempo de unas dos semanas

-Evaluación in vitro de la actividad antiviral o virucida en coronavirus bovino y actividad citotóxica de LL-37:

Estos ensayos se realizarán en el laboratorio BSL3 del INTA Castelar. Para completar los ensayos de citotoxicidad ampliaremos el rango de concentraciones de trabajo, determinando así la concentración citotóxica 50% (CC50), para esto determinaremos viabilidad celular mediante la técnica de reducción del XTT. Una vez obtenido este valor continuaremos con los experimentos de actividad antiviral de los péptidos catiónicos in vitro frente al virus de la diarrea viral bovina. Para ésto células MDBK serán infectadas con el coronavirus bovino y tratadas con los diferentes compuestos, durante el experimento completo o en las diferentes etapas que involucran el proceso de infección (pre-incubación con el virus, durante la adsorción viral, post-adsorción viral, pre-incubación con células) realizando un ensayo de tiempo de adición.

- Estudio de viabilidad por cristal violeta:

Células MDBK serán sembradas en placas de 96 pocillos hasta alcanzar la confluencia deseada y serán expuestas a distintas concentraciones del péptido durante 48 h a 37°C con 5% CO₂. Una vez finalizada la incubación, las células serán fijadas, se adicionará el colorante cristal violeta 0,1% y se incubarán durante 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se retira el cristal violeta y se agrega metanol para solubilizar el colorante. La lectura se realiza en espectrofotómetro a 540 nm.

- Estudio de actividad metabólica por XTT:

La actividad metabólica de las células MDBK pre-tratadas con los diferentes compuestos será medida con TACS® XTT Cell proliferation Assay Kit (TREVIGEN, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y tal como fue explicado anteriormente.

-Evaluación de LL-37 en SARS-COV-2

Estos ensayos se realizarán mediante protocolos y metodología internacionalmente validada para confirmar que los resultados observados en coronavirus bovino se repican en la cepa de SARS-COV-2. Estos estudios se realizarán en la Universidad Estatal de Utah, EEUU, como un servicio a terceros. El responsable del servicio será el Dr. Brett L. Hurst, del Institute for Antiviral Research de dicha universidad. Con quien ya hemos tenido comunicación personal y nos brindó detalles del servicio, la disponibilidad y los costos.

-Obtención de LL-37 de forma recombinante:

Expresión del péptido en bacterias E.coli recombinantes. Además de la expresión, se llevarán adelante por lo menos dos protocolos adecuados para su purificación, con el fin de poder transferir el know how a la industria. Poder disponer de un clon de E. coli o levaduras recombinante con alta producción del péptido acompañado de un protocolo de purificación adecuado, significa un paso adelante en el scaling up

000033

industrial.

En el lapso de tiempo previsto de 12 meses se propone:

-Diseñar las construcciones genéticas en los vectores de expresión seleccionados

-Inducir la expresión del péptido como proteína de fusión para su mejor solubilidad y evitar así su degradación

-Purificación del péptido por cromatografía de afinidad a la proteína de fusión, o por un protocolo de purificación por exclusión molecular seguido de intercambio iónico.

-Evaluación de la estructura y actividad biológica del péptido. El péptido obtenido se analizará por dicroísmo circular para confirmar su correcto plegamiento como hélice alfa en contacto con membranas, se secuenciará la región N terminal y se evaluará su actividad antimicrobiana en bacterias de referencia como medida de su actividad biológica.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Jakovac H Am J Physiol Endocrinol Metab. 2020
- 2) Mily A et al. *Oral intake of phenylbutyrate with or without vitamin D3 upregulates the cathelicidin LL-37 in human macrophages: a dose finding study for treatment of tuberculosis.* BMC Pulm Med. 2013
- 3) Lai Y, et al Trends Immunol. 2009
- 4) Bergman P, et al Curr HIV Res 2007.
- 5) Peter G. Barlow et al. PLOS One 2011
- 6) Akhirunnesa Mily et. al. PLoS One. 2015
- 7) Martinez et al. Microb Pathog 2020

ARTICULACIÓN INSTITUCIONAL:

Este proyecto se articula con el PICT-O UNAHUR "Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes y evaluación de su actividad virucida y antiinflamatoria con potencial uso en salud"

Director : Paulo Maffía

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

Total 12 meses

1. *Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a coronavirus bovino en cultivo in vitro: Mes1-2*
2. *Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a SARS COV 2 en cultivo in vitro: Mes 1-2*
3. *Obtención de la concentración efectiva 50, porcentaje de inhibición del rendimiento viral y efecto citopático en ambas cepas de virus: Mes 3-5*
4. *Obtención del péptido LL-37 por técnicas de ADN recombinante y*

000033
purificación: Mes 4-12
**RECURSOS HUMANOS
INVOLUCRADOS:**

Nombre y Apellido	Email
1. Paulo Maffia	<i>paulo.maffia@unahur.edu.ar</i>
2. Marcela Pilloff	<i>Marcela.pilloff@unahur.edu.ar</i>
3. Melina Martinez	<i>melinambmartinez@gmail.com</i>
4. Alejandra Capozzo	<i>alejandra_capozzo@yahoo.com.ar</i>
5. Nancy Cardoso	<i>cardoso.nancy@inta.gob.ar</i>

PRESUPUESTO:

Rubro	Monto solicitado
<i>Licencias</i>	<i>\$ 0.-</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>\$ 0.-</i>
<i>Bienes de consumo</i>	<i>\$ 395.000</i>
<i>Equipamiento</i>	<i>\$0.-</i>
<i>Viajes y viáticos</i>	<i>\$ 0.-</i>
<i>Difusión y/o protección de resultados</i>	<i>\$ 0.-</i>
<i>Servicios de terceros</i>	<i>\$ 210.000</i>
<i>Trabajo de campo</i>	<i>\$ 0.-</i>
TOTAL:	\$ 605.000

**CONSIDERACIONES
ÉTICAS:**
Completar solo si corresponde

000033

9. DECLARACIÓN JURADA

**CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (ART. 11)**

DECLARACIÓN JURADA

El que suscribe postula en carácter de Director el proyecto titulado” **Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como antiviral frente a SARS-COV-2**” a la *CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (ART. 11)*.

En caso de que el mismo sea acreditado por el Consejo Superior para recibir el correspondiente subsidio me comprometo a cumplir con los términos establecidos en el Reglamento de Investigación y los lineamientos establecidos en el Estatuto de la Universidad, los cuales declaro haber leído y aceptado, asimismo como las pautas administrativas vigentes y eventuales que exija la UNAHUR,.

Declaro también que todos los datos presentados durante el proceso de inscripción a la convocatoria son veraces y exactos, de acuerdo a mi saber y entender. Asimismo me notifico que cualquier falsedad, ocultamiento u omisión podrán dar lugar a las intervenciones administrativas que correspondan y apliquen.

Hurlingham, 14 de Mayo de 2020

Lugar y fecha



Firma y aclaración

000104

BUENOS AIRES, 29 de mayo de 2020

VISTO el Estatuto de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, la Ley 24.521, la Política de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (R.C.S. N° 11/15), el Reglamento de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (R.C.S. N° 08/16, 59/16 y 87/17) y el Expediente Nro. 132/2020 de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM; y,

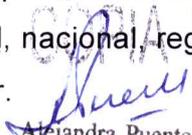
CONSIDERANDO:

Que la Ley 24.521 de Educación Superior establece en su artículo 28 inc. b) que son funciones básicas de las instituciones universitarias promover y desarrollar la investigación científica.

Que el artículo 81 de Estatuto Universitario establece que la misma asumirá la investigación científica como una de sus funciones sustanciales, en concordancia con lo establecido por la Ley 24.521, y conforme a lo establecido en los órganos de gobierno, teniendo como objetivos principales la producción de conocimiento y la formación de recursos humanos para la investigación.

Que dicha función será abordada a partir de la implementación de planes, programas y proyectos de investigación, de acuerdo al artículo 82 del mencionado estatuto.

Que mediante Resolución N° 11/15 del Consejo Superior se aprobó la Política de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, en donde se propone el desarrollo de un modelo de investigación entendido como construcción de conocimiento colectivo, participativo, interdisciplinario a partir de problemáticas relevantes, pertinentes y oportunas para comprender la realidad social-local, nacional, regional y mundial- y actuar en ella transformándola en un sentido emancipador.


Alejandra Puente
Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

Que mediante Resolución N° 8/16 del Consejo Superior se aprobó el Reglamento de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, luego modificado mediante las Resoluciones N° 59/16 y 87/17.

Que el Artículo 11 del Reglamento de Investigación de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM incorporado mediante la Resolución N° 59/16, y luego ratificado por la Resolución N° 87/17, prevé el "(...) financiamiento de propuestas de investigación de manera extraordinaria, que resultasen de interés para la Universidad (...). Dichos proyectos presentados de forma extraordinaria fuera de las convocatorias regulares deberán representar un interés particular desde la temática o desarrollo científico tecnológico propuesto, o bien una urgencia estratégica desde su implementación".

Que ante la situación de pandemia generada por el SARS-COV-2, el Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SNCTI) en su conjunto se ha puesto a disposición del Poder Ejecutivo Nacional (PEN) para su mitigación, a través del desarrollo de proyectos de investigación básica y aplicada que presenten soluciones a corto y mediano plazo.

Que la UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM, como parte del SNCTI, pone a disposición su infraestructura, equipamiento y capital intelectual para el desarrollo de actividades I+D conforme a lo establecido en su Estatuto, en relación a la pertinencia de las mismas a nivel local, regional y nacional.

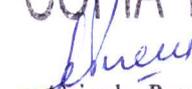
Que la Secretaría de Investigación pone a consideración el proyecto "Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como antiviral frente a SARS-COV-2", a cargo del docente/investigador Dr. Paulo Maffía.

Que el Secretario Administrativo Financiero y Técnico ha tomado la intervención de su competencia e informa que la UNAHUR cuenta con fondos propios para hacer frente a la propuesta.

Que la Dirección General de Asuntos Legales ha tomado la intervención de su competencia y ha emitido dictamen.-

Que la presente medida se dicta en uso de las atribuciones conferidas en el artículo 35 inciso cc) del Estatuto de la Universidad.-

ES COPIA FIEL


Alejandra Puente
Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

Por ello,

EL VICERRECTOR-RECTOR EN EJERCICIO
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM

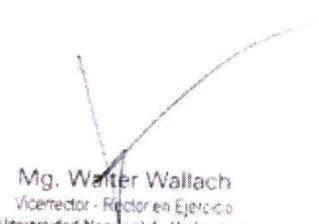
RESUELVE:

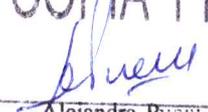
ARTÍCULO 1°. – Aprobar "Ad referéndum" del Consejo Superior el proyecto de investigación "Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como antiviral frente a SARS-COV-2", dirigido por el Dr. Paulo Maffía, que como Anexo pasa a formar parte integrante de la presente resolución.

ARTÍCULO 2°. - Incorporar la presente Resolución en el orden del día de la siguiente sesión del Honorable Consejo Superior de esta casa de altos estudios.

ARTÍCULO 3°. - Comuníquese, regístrese y archívese.

RESOLUCIÓN R. N° **000104**


Mg. Walter Wallach
Vicerector - Rector en Ejercicio
Universidad Nacional de Hurlingham

ES COPIA FIEL

Alejandra Puente
Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

ANEXO

**CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (ART. 11)**

PLAN DE TRABAJO

DIRECTOR/A:

Dr. Paulo Maffia

TÍTULO:

**Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como
antiviral frente a SARS-COV-2**

**FUNDAMENTACIÓN:
(hasta 400 palabras)**

Actualmente, no hay medicamentos u otras terapias aprobadas para prevenir o tratar el COVID-19. El tratamiento clínico actual incluye medidas de prevención y control de infecciones y atención de apoyo, incluido oxígeno suplementario y soporte ventilatorio mecánico cuando esté indicado. Una opción terapéutica promisorio recientemente postulada es el tratamiento con dosis altas de vitamina D3 a pacientes críticos de COVID-19 (1). Este tratamiento induce, entre otras cosas, a la expresión del péptido de defensa humano catelicidina LL-37 por macrófagos y células epiteliales (2). La inducción del péptido de defensa LL-37 a través de la administración de VitD3 y/o fenilbutirato ha sido demostrado en varios trabajos. En un ensayo clínico completado y publicado (3) se reportó que la administración de VitD3 junto con 4-phenyl butyrate (PBA) indujeron la expresión de LL-37 en pacientes con tuberculosis activa (dosis usadas: Fenilbutirato de sodio: 500 mg dos veces al día por vía oral durante 2 meses; Colecalciferol: 5000 UI una vez al día por vía oral durante 2 meses). El tratamiento con PBA, vitD3 o la combinación redujo los síntomas clínicos. En línea con una mejora de los resultados primarios, el tratamiento con PBA y vitD3 también dió como resultado una mayor expresión sinérgica de LL-37 en células inmunes concomitante a una mayor muerte intracelular de Mycobacterium tuberculosis en macrófagos ex vivo. En este contexto se torna indispensable para sustentar esta novedosa opción terapéutica en COVID-19, el soporte científico in vitro, de tipo "proof of concept", evaluando una de las moléculas más importantes entre los péptidos de defensa humanos con actividad antiviral que se inducen durante este tratamiento, la catelicidina LL-37. Los resultados hasta aquí obtenidos tanto por nuestro grupo, como por otros investigadores, han demostrado que los péptidos antimicrobianos, tanto los de diseño como los naturales o endógenos, poseen un gran potencial como posibles nuevos fármacos frente a diversos patógenos de la salud humana (4,5,6) Desde hace años nuestro grupo ha venido estudiando diversas secuencias peptídicas derivadas de péptidos de defensa del sistema inmune innato, con actividad frente a patógenos bacterianos (7). En el último año además hemos incorporado una línea de investigación dedicada a la evaluación de péptidos antivirales.

Nuestros resultados previos in vitro con un péptido de diseño y con la catelicidina humana LL-37, realizados en el Instituto de Virología Animal de INTA Castelar, en un flavivirus como el virus de la diarrea viral bovina (BDVB) han sido alentadores, demostrando inhibición de la replicación viral y baja toxicidad. En éstos trabajos previos pudimos comprobar que la incubación con el péptido disminuye significativamente el título viral en un cultivo celular infectado.

ES COPIA FIEL

Alejandra Puente
Alejandra Puente
Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

OBJETIVO GENERAL:

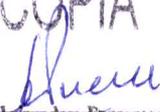
Demostrar mediante ensayos *in vitro* correctamente diseñados y validados, que la nueva opción terapéutica basada en la inducción del péptido de defensa LL-37 es totalmente viable y promisorio en pacientes con COVID19

En función de los promisorios resultados previos y de la urgencia de nuevas opciones terapéuticas, en caso de demostrar actividad antiviral *in vitro* correctamente validada, significaría un gran paso, ya que sustentaría de manera sólida la opción terapéutica basada en la inducción de éste péptido de defensa o como terapia combinada a las otras en evaluación. Estos resultados brindarían el sustento experimental necesario a los protocolos clínicos de administración de vitaD_3 (como para tuberculosis activa), en donde inducen la expresión de ésta molécula de manera endógena por las propias células epiteliales y/o por macrófagos en pulmón. La vitamina D3 es un suplemento accesible económicamente que podría significar una mejora considerable para los pacientes internados. Paralelamente en este proyecto se propone también **la obtención de forma recombinante del péptido, que incluya su expresión y purificación por protocolos escalables y transferibles a la industria.** Reemplazando así la importación de ésta molécula y generando el *know how* necesario en su producción local. Este objetivo encuentra sustento en la posible administración del péptido LL-37 recombinante de manera aerosolizada a pulmón en un futuro cercano, para aumentar aún más la concentración de ésta molécula y concomitantemente su actividad biológica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. *Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a coronavirus bovino en cultivo in vitro*
2. *Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a SARS COV 2 en cultivo in vitro*
3. *Obtención de la concentración efectiva 50, porcentaje de inhibición del rendimiento viral y efecto citopático en ambas cepas de virus*
4. *Obtención del péptido LL-37 por técnicas de ADN recombinante y purificación*

ES COPIA FIEL


Alejandra Puccio

Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

**MATERIALES Y
MÉTODOS:**
(hasta 400 palabras)

Obtención del péptido LL-37 por síntesis automatizada con pureza mayor a 95%. Para esto se dispondrá la compra del producto purificado y liofilizado a la empresa GenScript USA, quienes pueden sintetizar y enviar el péptido en lapsos de tiempo de unas dos semanas

-Evaluación in vitro de la actividad antiviral o virucida en coronavirus bovino y actividad citotóxica de LL-37:

Estos ensayos se realizarán en el laboratorio BSL3 del INTA Castelar. Para completar los ensayos de citotoxicidad ampliaremos el rango de concentraciones de trabajo, determinando así la concentración citotóxica 50% (CC50), para esto determinaremos viabilidad celular mediante la técnica de reducción del XTT. Una vez obtenido este valor continuaremos con los experimentos de actividad antiviral de los péptidos catiónicos in vitro frente al virus de la diarrea viral bovina. Para esto células MDBK serán infectadas con el coronavirus bovino y tratadas con los diferentes compuestos, durante el experimento completo o en las diferentes etapas que involucran el proceso de infección (pre-incubación con el virus, durante la adsorción viral, post-adsorción viral, pre-incubación con células) realizando un ensayo de tiempo de adición.

• Estudio de viabilidad por cristal violeta:

Células MDBK serán sembradas en placas de 96 pocillos hasta alcanzar la confluencia deseada y serán expuestas a distintas concentraciones del péptido durante 48 h a 37°C con 5% CO₂. Una vez finalizada la incubación, las células serán fijadas, se adicionará el colorante cristal violeta 0,1% y se incubarán durante 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se retira el cristal violeta y se agrega metanol para solubilizar el colorante. La lectura se realiza en espectrofotómetro a 540 nm.

• Estudio de actividad metabólica por XTT:

La actividad metabólica de las células MDBK pre-tratadas con los diferentes compuestos será medida con TACS® XTT Cell proliferation Assay Kit (TREVIGEN, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y tal como fue explicado anteriormente.

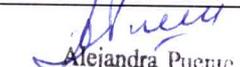
-Evaluación de LL-37 en SARS-COV-2

Estos ensayos se realizarán mediante protocolos y metodología internacionalmente validada para confirmar que los resultados observados en coronavirus bovino se repican en la cepa de SARS-COV-2. Estos estudios se realizarán en la Universidad Estatal de Utah, EEUU, como un servicio a terceros. El responsable del servicio será el Dr. Brett L. Hurst, del Institute for Antiviral Research de dicha universidad. Con quien ya hemos tenido comunicación personal y nos brindó detalles del servicio, la disponibilidad y los costos.

-Obtención de LL-37 de forma recombinante:

Expresión del péptido en bacterias E.coli recombinantes. Además de la expresión, se llevarán adelante por lo menos dos protocolos adecuados para su purificación, con el fin de poder transferir el know how a la industria. Poder disponer de un clon de E. coli o levaduras recombinante con alta producción del péptido acompañado de un protocolo de purificación adecuado, significa un paso adelante en el scaling up industrial.

En el lapso de tiempo previsto de 12 meses se propone:



Alejandra Puente
Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

-Diseñar las construcciones genéticas en los vectores de expresión seleccionados

-Inducir la expresión del péptido como proteína de fusión para su mejor solubilidad y evitar así su degradación

-Purificación del péptido por cromatografía de afinidad a la proteína de fusión, o por un protocolo de purificación por exclusión molecular seguido de intercambio iónico.

-Evaluación de la estructura y actividad biológica del péptido. El péptido obtenido se analizará por dicroísmo circular para confirmar su correcto plegamiento como hélice alfa en contacto con membranas, se secuenciará la región N terminal y se evaluará su actividad antimicrobiana en bacterias de referencia como medida de su actividad biológica.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Jakovac H Am J Physiol Endocrinol Metab. 2020
- 2) Mily A et al. *Oral intake of phenylbutyrate with or without vitamin D3 upregulates the cathelicidin LL-37 in human macrophages: a dose finding study for treatment of tuberculosis.* BMC Pulm Med. 2013
- 3) Lai Y, et al Trends Immunol. 2009
- 4) Bergman P, et al Curr HIV Res 2007.
- 5) Peter G. Barlow et al. PLOS One 2011
- 6) Akhirunnesa Mily et. al. PLoS One. 2015
- 7) Martinez et al. Microb Pathog 2020

ARTICULACIÓN INSTITUCIONAL:

Este proyecto se articula con el PICT-O UNAHUR "Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes y evaluación de su actividad virucida y antiinflamatoria con potencial uso en salud"

Director : Paulo Maffía

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

Total 12 meses

1. Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a coronavirus bovino en cultivo in vitro: Mes1-2
2. Evaluación del péptido de defensa LL-37 frente a SARS COV 2 en cultivo in vitro: Mes 1-2
3. Obtención de la concentración efectiva 50, porcentaje de inhibición del rendimiento viral y efecto citopático en ambas cepas de virus: Mes 3-5
4. Obtención del péptido LL-37 por técnicas de ADN recombinante y purificación: Mes 4-12

RECURSOS HUMANOS INVOLUCRADOS:

Nombre y Apellido	Email
1. Paulo Maffia	paulo.maffia@unahur.edu.ar
2. Marcela Pilloff	Marcela.pilloff@unahur.edu.ar

ES COPIA FIEL

Aleandra Pucnic
Aleandra Pucnic
Jefa Departamento de Despacho
Universidad Nacional de Hurlingham

	3. <i>Melina Martinez</i>	<i>melinambmartinez@gmail.com</i>
	4. <i>Alejandra Capozzo</i>	<i>alejandra_capozzo@yahoo.com.ar</i>
	5. <i>Nancy Cardoso</i>	<i>cardoso.nancy@inta.gob.ar</i>

PRESUPUESTO:

<i>Rubro</i>	<i>Monto solicitado</i>
<i>Licencias</i>	\$ 0.-
<i>Bibliografía</i>	\$ 0.-
<i>Bienes de consumo</i>	\$ 395.000
<i>Equipamiento</i>	\$ 0.-
<i>Viajes y viáticos</i>	\$ 0.-
<i>Difusión y/o protección de resultados</i>	\$ 0.-
<i>Servicios de terceros</i>	\$ 210.000
<i>Trabajo de campo</i>	\$ 0.-
TOTAL:	\$ 605.000

**CONSIDERACIONES
ÉTICAS:**

Completar solo si corresponde



9. DECLARACIÓN JURADA

CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (ART. 11)

DECLARACIÓN JURADA

El que suscribe postula en carácter de Director el proyecto titulado " **Evaluación del péptido de defensa humano LL-37 como antiviral frente a SARS-COV-2**" a la CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE HURLINGHAM (ART. 11).

En caso de que el mismo sea acreditado por el Consejo Superior para recibir el correspondiente subsidio me comprometo a cumplir con los términos establecidos en el Reglamento de Investigación y los lineamientos establecidos en el Estatuto de la Universidad, los cuales declaro haber leído y aceptado, asimismo como las pautas administrativas vigentes y eventuales que exija la UNAHUR,.

Declaro también que todos los datos presentados durante el proceso de inscripción a la convocatoria son veraces y exactos, de acuerdo a mi saber y entender. Asimismo me notifico que cualquier falsedad, ocultamiento u omisión podrán dar lugar a las intervenciones administrativas que correspondan y apliquen.

Hurlingham, 14 de Mayo de 2020

Lugar y fecha



Firma y aclaración

