

Efecto antiviral de la ivermectina en dosis altas en adultos con COVID-19: un ensayo piloto aleatorizado, controlado, abierto y multicéntrico.

Alejandro Krolewiecki 1*, Adrián Lifschitz 2, Matías Moragas 3, Marina Travacio 4, Ricardo Valentini 5, Daniel F. Alonso 6, Rubén Solari 7, Marcelo A. Tinelli 8, Rubén O. Cimino 1, Luis Álvarez 2, Pedro E. Fleitas 1, Laura Ceballos 2, Marcelo D. Golemba 3, Florencia Fernández 3, Diego Fernández de Oliveira 5, German Astudillo 7, Inés Baeck 5, Javier Farina 9, Marcelo D. Guthmann 6, 8, Georgina A. Cardama 6, Andrea Mangano 3, Eduardo Spitzer 8 **, Silvia Gold 10 **, Carlos Lanusse 2**.

1 Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IIET-CONICET), Sede Regional Orán, Universidad Nacional de Salta, Argentina.

2 Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICETCICPBA-UNCPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina.

3 Unidad de Virología y Epidemiología Molecular, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"- CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

4 Cátedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

5 Departamento de Medicina. Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Buenos Aires, Argentina.

6 Centro de Oncología Molecular y Traslacional (COMTra) y Plataforma de Servicios Biotecnológicos, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

7 Hospital Francisco J. Muñoz, Buenos Aires, Argentina.

8 Laboratorio Elea/Phoenix. Los Polvorines, Argentina.

9 Servicio de Infectología. Hospital Cuenca Alta, Cañuelas, Argentina.

10 Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina.

Pre-impresión, The Lancet, 11 de noviembre de 2020

RESUMEN

Antecedentes

Existen limitadas opciones antivirales para el tratamiento de los pacientes con enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) que hayan demostrado eficacia clínica y ninguno de ellos es un fármaco oral.

La ivermectina (IVM), una lactona macrocítica con un amplio espectro antiparasitario, ha demostrado tener una potente actividad in vitro contra el SARS-CoV-2 en cultivos celulares.

Métodos

Completamos un ensayo clínico piloto, aleatorizado, controlado y cegado para el evaluador de los resultados, con el objetivo de evaluar la actividad antiviral de dosis altas de IVM en pacientes con COVID-19. Los pacientes elegibles eran adultos (de 18 a 69 años) con infección por SARS-CoV-2 leve o moderado confirmado por RT-PCR, dentro de los 5 días posteriores al inicio de los síntomas. 45 pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 2: 1 para estándar de atención más IVM oral a 0,6 mg/ kg/ día durante 5 días versus estándar de atención. El criterio primario de valoración fue la reducción de la carga viral en las secreciones respiratorias en el día 5. La carga viral en las secreciones respiratorias se midió mediante RT-PCR cuantitativa. Las concentraciones de IVM en plasma fueron medidas en varios días de tratamiento. Este ensayo está registrado en ClinicalTrials.gov, NCT004381884.

Hallazgos

El ensayo se desarrolló entre el 18 de mayo y el 29 de septiembre de 2020 con 45 pacientes aleatorizados (30 en el Grupo IVM y 15 controles). No hubo diferencia en la reducción de la carga viral entre los grupos, pero se encontró una diferencia significativa en la reducción en pacientes con niveles medios de IVM en plasma más altos (72% IQR 59 - 77) versus controles no tratados (42% IQR 31 - 73) ($p = 0,004$). Los niveles medios de la concentración plasmática de ivermectina también mostraron una correlación positiva con la tasa de descomposición viral ($r: 0,47$, $p = 0,02$). Se notificaron eventos adversos en 5 (33%) de los pacientes en los controles y 13 (43%) en el grupo tratado con IVM, sin una relación entre los niveles plasmáticos de IVM y los eventos adversos.

Interpretación

En este ensayo piloto se identificó una actividad antiviral dependiente de la concentración de IVM oral en dosis altas, con un régimen de dosificación que fue bien tolerado. Se necesitan ensayos grandes con criterios de valoración clínicos para determinar la utilidad clínica de IVM en COVID-19.

Financiamiento: Este trabajo fue apoyado por la subvención IP-COVID-19-625 de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, Argentina y Laboratorio ELEA / Phoenix, Argentina.

INVESTIGACIÓN EN CONTEXTO

Evidencia antes de este estudio

El papel potencial de la ivermectina contra el SARS-CoV-2 se informó por primera vez en abril de 2020 cuando un grupo australiano publicó resultados in vitro. Desde entonces, múltiples artículos de opinión y estudios no controlados intentaron comprender el significado de esos resultados y la utilidad de la ivermectina en COVID-19. Se realizaron búsquedas en Clinicaltrials.gov el 16 de octubre e identificamos 39 ensayos registrados. Una búsqueda en Pubmed en la misma fecha identificó 72 artículos publicados sobre ("COVID" o "SARS") e "Ivermectina", ninguno de ellos era un ensayo clínico o ensayo controlado aleatorio.

Valor agregado de este estudio

Nuestro estudio es el primero que aporta evidencia de la actividad antiviral de la ivermectina contra el SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19, a través de ensayo clínico ciego, aleatorizado y controlado. La incorporación de determinaciones cuantitativas de carga viral y las mediciones de los niveles plasmáticos de ivermectina permiten una interpretación en profundidad de los datos y la identificación de las concentraciones sistémicas de ivermectina necesarias para un efecto antiviral significativo. El uso de un grupo de control no tratado destaca la necesidad de ensayos controlados y sobre la dinámica de la carga viral en la historia natural de COVID-19. Finalmente, también agregamos más información sobre la seguridad de la ivermectina en dosis altas.

Implicaciones de toda la evidencia disponible

Se identificó un efecto antivírico dependiente de la concentración de la ivermectina en COVID-19, con reducciones significativas en la carga viral del SARS-CoV-2 en las secreciones respiratorias entre los pacientes, logrando una alta concentración de ivermectina sistémica en comparación con los controles no tratados. Estos resultados, que no mostraron toxicidad relacionada con el uso de ivermectina en dosis altas, proporcionan evidencia del efecto antiviral y apoyan el diseño de ensayos para investigar las implicaciones clínicas de nuestras recomendaciones. También se requieren estudios adicionales de los factores involucrados en la biodisponibilidad oral de la ivermectina.

Introducción

La aparición de un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2 en Wuhan en diciembre de 2019 y su propagación pandémica causando el COVID-19 en una escala mundial, con más de 33 millones de casos notificados y 1 millón de muertes a finales de septiembre 2020, ha impulsado la búsqueda de intervenciones farmacológicas para tratar, prevenir y mitigar las consecuencias de esta infección respiratoria aguda potencialmente devastadora. Se han evaluado varios agentes terapéuticos en diferentes etapas de la enfermedad como posibles terapias antivirales; la mayoría de como parte de una estrategia de reutilización de fármacos para principios activos que ya se utilizan en otros tratamientos. Aunque diferentes moléculas como hidroxiclороquina, lopinavir y remdesivir han demostrado actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 in vitro, la evidencia de los ensayos clínicos controlados solo ha demostrado beneficios clínicos para el remdesivir intravenoso en subgrupos de pacientes hospitalizados. ¹

La ivermectina (IVM) es un fármaco antiparasitario ampliamente utilizado contra varias enfermedades por filarias, sarna, y estrongiloidiasis, con más de 900 millones de comprimidos distribuidos en 2019 a través de la OMS para el tratamiento de la oncocercosis y la filariasis linfática, como parte de la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS.^{2,3} Después de décadas de uso intensivo, seguro y eficaz, la IVM ha más recientemente se evaluó para posibles nuevas indicaciones, incluida la malaria y varias infecciones virales que demostraron ser susceptibles a la IVM in vitro como el dengue, el zika y la influenza.⁴

Se informó una potente actividad contra el SARS-CoV-2 en cultivos de células Vero-hSLAM utilizando altas concentraciones de IVM.⁵ Diferentes modelos farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) sugirieron que las concentraciones plasmáticas extremadamente altas necesarias para el efecto antiviral observado in vitro requeriría dosis lejos de las utilizadas con seguridad en humanos, para alcanzar concentraciones cercanas a 2 μM , la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC50) requerida contra el SARS-CoV-2 in vitro.⁶ La IVM se prescribe en regímenes basados en el peso, con mayor frecuencia a 0,2 mg/kg, aunque 0,4 mg/kg está aprobado para las infecciones por *Wuchereria bancrofti*.⁷ Basado en su perfil de seguridad, los regímenes de dosificación más altos están bajo evaluación debido a su utilidad potencial para nuevas indicaciones y estrategias de dosificación.^{7,8}

Evaluar la actividad antiviral y el perfil de seguridad de la IVM en dosis altas en pacientes con COVID-19 y para avanzar en el conocimiento sobre el papel de este fármaco, completamos una prueba de ensayo clínico controlado aleatorizado en pacientes hospitalizados con enfermedad leve y moderada. Para conseguir más información sobre la posible utilidad clínica de la IVM en COVID-19, se investigó la relación entre los aspectos de PK (exposición sistémica) y PD (dinámica de la carga viral). Aquí presentamos los resultados del ensayo con descripciones sobre el impacto de la IVM en la carga viral de SARS-CoV-2 en las secreciones respiratorias.

Métodos

Diseño del estudio y participantes

Un ensayo multicéntrico, aleatorizado individualmente, abierto, cegado de los resultados para el observador y controlado, para evaluar la actividad antiviral y la seguridad, de un régimen de 5 días de dosis alta de IVM, versus ningún tratamiento, en una proporción de asignación de 2: 1, en pacientes adultos hospitalizados con COVID-19 leve a moderado. Todos los pacientes de ambos grupos recibieron atención estándar. El ensayo se realizó en 4 hospitales del Área Metropolitana de Buenos Aires, Argentina.

Se obtuvo la aprobación ética de los Comités de Ética Institucionales Independientes y de las agencias reguladoras nacionales y de distrito. Todas las personas participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito. El ensayo se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Este estudio está registrado en ClinicalTrials.gov, NCT004381884.

Los participantes elegibles fueron pacientes con COVID-19, de 18 a 69 años con infección confirmada por RT-PCR, hospitalizados, con etapas de enfermedad 3 a 5 de la escala ordinal de 8 categorías de estado clínico de la OMS, y sin necesidad de ingreso en unidad de cuidados intensivos. Los criterios de elegibilidad incluían inicio de los síntomas del COVID-19 ≤ 5 días en el momento del

reclutamiento, ausencia de uso de fármacos con potencial actividad contra el SARS-CoV-2 disponibles en Argentina durante el ensayo (hidroxicloroquina, cloroquina, lopinavir y azitromicina); y esas drogas no fueron permitidas durante la primera semana del ensayo. Los criterios de exclusión incluyeron el uso de inmunomoduladores dentro de los 30 días del reclutamiento, embarazo, lactancia, comorbilidades mal controladas y alergias conocidas a la IVM. Los pacientes en edad fértil (hombres y mujeres) eran elegibles si estaban de acuerdo en tomar medidas anticonceptivas (incluyendo anticoncepción hormonal, métodos de barrera o abstinencia) durante el período del estudio y al menos 30 días después de la última administración del fármaco del estudio.

Aleatorización y enmascaramiento

Los participantes inscriptos fueron asignados aleatoriamente (2: 1) al grupo de IVM o al grupo control no tratado. La aleatorización se estratificó para cada centro. La secuencia de aleatorización fue preparada por un sistema centralizado basado en la web en bloques de tamaño variable (3, 6 o 9 casos por bloque) y comunicada a los médicos del ensayo, una vez que reclutaron a los pacientes, al ingresar al sistema web, con la información sobre la disponibilidad del formulario de consentimiento informado firmado y la verificación de todos criterios de elegibilidad. Los pacientes, enfermeras y médicos no estaban cegados al grupo de tratamiento.

Los evaluadores de los resultados (personal de virología) estaban cegados al grupo de tratamiento al recibir las muestras etiquetadas con código de aleatorización y número de visita.

Procedimientos

Todos los pacientes participantes fueron evaluados al ingresar al estudio, cuando se realizó una historia clínica y un examen físico completo, incluido el peso y la altura. Los pacientes del grupo IVM recibieron tratamiento oral durante 5 días consecutivos con el desayuno o el almuerzo, a intervalos de aproximadamente 24 horas. Se utilizó IVM 6 mg, comprimidos ranurados (IVER P, Laboratorios Elea / Phoenix, Argentina) en todos los casos, a dosis de 0,6 mg/kg/día basada en el redondeo del peso inicial al total inferior (6 mg) y la mitad (3 mg) de dosis. Los pacientes fueron evaluados diariamente por enfermeras del hospital y médicos de los equipos de investigación en cada hospital durante el período inicial de 7 días y del día 21 al 30, desde el ingreso al estudio. Todos hallazgos clínicos, incluidos los eventos adversos y la medicación concomitante, se registraron y luego se ingresó en un formulario de informe de caso electrónico que fue monitoreado y validado por el personal del ensayo. Se recogieron hisopados nasofaríngeos al inicio del estudio y a las 24, 48 y 72 horas y el día 5, para la cuantificación de la carga viral del SARS-CoV-2. Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción para las concentraciones plasmáticas de IVM, 4 horas después de la ingesta del fármaco en los días de tratamiento 1, 2, 3, y 5 (con el objetivo de medir los niveles plasmáticos máximos) y el día 7 (con el objetivo de estimar la eliminación del fármaco) en el grupo IVM. Se obtuvieron muestras de sangre de los participantes de ambos grupos para parámetros hematológicos y químicos.

Resultados

La medida de resultado primario fue la reducción de la carga viral del SARS-CoV-2 entre el inicio y el día 5 en ambos grupos. Los resultados secundarios incluyeron la evolución clínica al día 7, la relación

entre las concentraciones plasmáticas de IVM y el resultado primario, y la frecuencia y gravedad de los eventos adversos en cada grupo.

Medidas de carga viral del SARS-CoV-2

La carga viral de SARS-CoV-2 de hisopados nasofaríngeos se cuantificó a partir de muestras almacenadas en medio de transporte viral a -80°C hasta su uso. Para el ensayo de carga viral, se extrajo ARN viral utilizando QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de $140\ \mu\text{L}$ de las muestras almacenadas. Luego, se realizó una PCR cuantitativa de transcriptasa inversa interna (RT-qPCR) dirigida al gen N de SARS-CoV-2. La curva estándar consistió en un ARN viral transcrito in vitro en serie diluido en una matriz de ARN celular de muestras nasofaríngeas negativas. Este ensayo incluyó la medición de un gen doméstico como control interno y normalizador. El gen de la limpieza del umbral de ciclo (Ct) se utilizó para corregir el Ct específico de SARS-CoV-2 según el número de las células en la muestra. Por lo tanto, las mediciones de carga viral se expresaron como \log_{10} de copias por reacción en lugar de \log_{10} copias por ml, como discutieron Han y colegas.⁹ La performance del ensayo incluye: i) eficiencia = 99%, ii) reproducibilidad con un coeficiente de variación (CV) entre 1,01 a 2,31, iii) repetibilidad con un CV entre 0,27 a 1,89%, iv) rango dinámico de 10 a 1×10^8 copias por reacción, v) especificidad = 100% probado contra muestras de SARS-CoV-2 negativas y un panel de virus respiratorios. Todos estos parámetros se determinaron según las directrices para ensayos de diagnóstico cuantitativo in vitro como se informó anteriormente.^{10,11}

Medición de perfiles de concentración plasmática de IVM

Las concentraciones de IVM en las muestras de plasma recolectadas de pacientes tratados fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia. La técnica de cromatografía se adaptó como se describió anteriormente.¹² Una alícuota de plasma se combinó con moxidectina (utilizado como patrón interno). Después de una extracción química mediada por acetonitrilo, la IVM se convirtió en una molécula fluorescente utilizando N-metilimidazol y anhídrido trifluoroacético (Sigma Chemical, St Louis, MO, EE. UU.). Una alícuota ($100\ \mu\text{L}$) de esta solución se inyectó directamente en el sistema de HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). El análisis de HPLC se realizó usando una columna C18 de fase inversa (Kromasil, Eka Chemicals, Bohus, Suecia, $5\ \mu\text{m}$, $4,6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$) y un ácido acético al 0,2% en agua / metanol / acetonitrilo ($1 \times 6/60/38 \times 4$) fase móvil a un caudal de $1 \times 5\ \text{ml} / \text{min}$ a $30^{\circ}\ \text{C}$. El detector fluorescente se fijó a $365\ \text{nm}$ (excitación) y $475\ \text{nm}$ (longitud de onda de emisión). La validación completa de los procedimientos analíticos utilizados para medir las concentraciones plasmáticas de IVM fue realizada. El coeficiente de determinación (r^2) de la curva de calibración fue 0,995. El porcentaje medio absoluto de recuperación del fármaco fue del 94%. La precisión del método mostró un coeficiente de variación por debajo del $8 \pm 1\%$. El límite de cuantificación del fármaco fue $0,3\ \text{ng/mL}$. Las concentraciones del fármaco en las muestras de plasma experimentales se obtuvieron mediante la integración del área de los picos utilizando el software Solution (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

Análisis farmacocinético y farmacodinámico de los datos

Las concentraciones plasmáticas del fármaco medidas en cada paciente en los diferentes momentos posteriores al tratamiento fueron graficadas. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron utilizando PK Solutions 2.0 (Ashland, Ohio, EE. UU.) Software informático. El área bajo las curvas de

concentración-tiempo de IVM para (AUC_{IVM}) (denominada exposición sistémica a fármacos) se calcularon mediante la regla trapezoidal¹³.

La estimación del área bajo las curvas de carga viral-tiempo (AUC_{VI}) se estimó como un indicador farmacodinámico de la actividad del fármaco. La tasa de desintegración viral se calculó a partir de la curva de carga-tiempo usando 4 puntos como $2.303 \times$ pendiente.¹³ El análisis de datos incluyó la estimación de la relación farmacológica PK/PD. La relación entre la exposición al fármaco (PK) (expresada como AUC_{IVM}) y la dinámica de la carga viral (PD) (expresada como AUC_{VI}) se estimó como un indicador de la relación entre la exposición a fármacos y la actividad antiviral.

Análisis estadístico

El diseño del ensayo incluyó un cálculo del tamaño de la muestra que se determinó según las recomendaciones actuales para ensayos piloto, indicando al menos 10 casos por grupo¹⁴ o basado en el cálculo del tamaño de la muestra para el ensayo clínico a gran escala e incluir al menos el 9% de ese tamaño para un intervalo de confianza del 80% (Cocks).¹⁵ Con base en estos motivos y el tamaño del efecto bajo (0,3), el tamaño de la muestra para un ensayo a gran escala sería 342 y un ensayo de al menos 31 según Cocks et al. En vista del presunto efecto de la IVM sobre la replicación del SARS-CoV-2 y la limitada información disponible sobre la dinámica viral en el momento del diseño del estudio (abril de 2020), el tamaño de la muestra de la prueba piloto con un error α de 0.05 y una potencia de 0.80 y un tamaño de efecto bajo de acuerdo con los efectos de tamaño estandarizados, se calculó 16 para una aleatorización 2:1 en 30 pacientes en el grupo IVM y 15 en el grupo control, para detectar diferencias entre los 2 grupos independientes en la disminución de la carga viral media en los hisopados nasofaríngeos entre el inicio y el día 5. Se compararon los grupos y se analizaron las variables continuas para determinar la significación estadística con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Se analizaron las correlaciones utilizando la prueba de rango de Spearman. El análisis de datos se realizó con GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (La Jolla California EE. UU. (www.graphpad.com)). El análisis estadístico para los parámetros PK y los porcentajes de reducción de la carga viral en el día 5 post-tratamiento se realizaron utilizando el software InStat 3.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.). Paramétrico (ANOVA, Bonferroni múltiple comparaciones) y no paramétricas (Kruskal-Wallis) se utilizaron para la comparación estadística. Cuando la diferencia entre los tres grupos fue significativa, las comparaciones por pares fueron realizadas con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Se utilizó correlación no paramétrica para la relación entre la reducción de la carga viral y la concentración sistémica de IVM. En todos los casos, los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Dos valores perdidos de carga viral fueron estimados por análisis de regresión utilizando los datos existentes.

Papel de la fuente de financiación

Los patrocinadores del estudio participaron en el diseño del estudio, pero no tuvieron ningún papel en la recopilación de datos primarios, los análisis de datos, la interpretación de datos, la redacción del informe o la decisión de enviarlo para su publicación. Todos los autores tuvieron acceso completo a todos los datos del estudio y tuvieron la responsabilidad final de la decisión para enviar para publicación.

Resultados

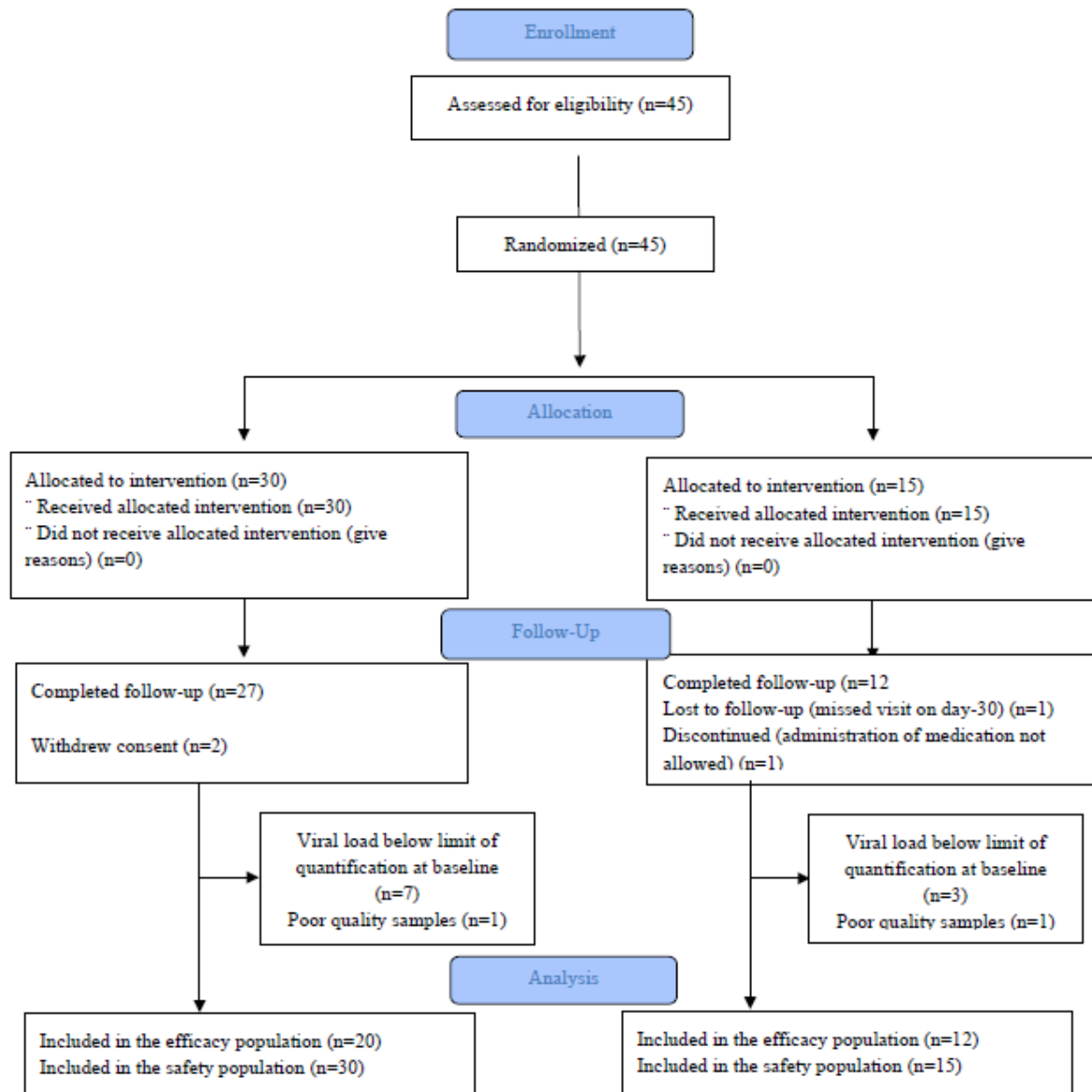
La inscripción comenzó el 18 de mayo y finalizó el 9 de septiembre de 2020, con 45 participantes reclutados entre los 4 hospitales participantes. El 29 de septiembre se completaron las últimas visitas programadas. Según lo planeado, 30 fueron asignados al azar al grupo de IVM y 15 al grupo de control no tratado. Dos de los sujetos retiraron el consentimiento en el grupo IVM; en 1 caso debido a una erupción leve y náuseas después de 1 dosis de IVM y la otra debido a ansiedad; en ambos casos, los eventos adversos se juzgaron como posiblemente relacionado con IVM y se resolvieron espontáneamente; los 28 sujetos restantes en el grupo IVM completaron el tratamiento. Todas las dosis de IVM se completaron durante la hospitalización. Un caso en el grupo de control se retiró del estudio debido al inicio de lopinavir el día 5 por progresión de la enfermedad. Todos los pacientes asignados al grupo de tratamiento lo comenzaron, por lo tanto, todos los sujetos fueron incluidos en el análisis de seguridad (figura 1). Se perdió un paciente del grupo de control para seguimiento después de la visita del día 7.

Las características basales mostraron una edad media de 40,89 (DE 12,48) entre los participantes del estudio, sin diferencias entre grupos; la distribución por sexos fue de 20 (44%) mujeres y 25 (56%) hombres (tabla 1). Las comorbilidades y los estadios de la enfermedad fueron similares entre los grupos; la comorbilidad más frecuente fue la obesidad en ambos grupos, seguida de la hipertensión, la diabetes y la enfermedad pulmonar obstructiva (tabla 1). El número de días entre el inicio de los síntomas y la inscripción tuvo una media (DE) de 3,6 días (1-4) en el grupo de control y 3,5 (1) en el grupo tratado, sin diferencias significativas entre grupos ni casos inscritos más allá del criterio de elegibilidad de hasta 5 días desde el inicio de los síntomas. No hay diferencias importantes en los síntomas clínicos, signos, ni los parámetros de laboratorio entre los grupos al inicio del estudio (tabla 1). Se registró progresión en 3 (7%) de la población de estudio; 2 en el grupo tratado y 1 en entre los controles, con 1 caso en el grupo de IVM que requirió ventilación mecánica invasiva y sin diferencias significativas en la evolución clínica al día 7 entre los grupos.

La carga viral cuantitativa al inicio del estudio de toda la población del mismo tenía una mediana (IQR) de 3,69 \log_{10} copias / reacción (1,97-5,74), incluidos 5 (11%) casos indetectables y otros 5 (11%) detectable aunque con <15 copias / reacción ($<1 \cdot 18 \log_{10}$ copias / reacción) al inicio, todos estos casos que permanecieron indetectables en la mayoría de las muestras durante el seguimiento y se excluyen del análisis de eficacia. No se detectaron diferencias en la carga viral entre hombres y mujeres. También se excluyeron 4 casos, incluidos 2 con muestras de mala calidad y 2 con retirada anticipada. Los 32 casos restantes (20 tratados y 12 controles) constituyen la población de análisis de eficacia (Figura 1). La carga viral basal en esta población tenía una mediana (IQR) de 5,59 \log_{10} copias / reacción (4,75 – 6,12) en el grupo de control y 3,74 \log_{10} copias / reacción (2,8 – 5,79) en el grupo de tratamiento ($p = 0 \cdot 08$) (tabla 1). La dinámica de la carga viral cambió de manera similar en ambos grupos durante el período del estudio, sin diferencias significativas y disminuyendo con el tiempo (figura 2).

La estimación de la exposición sistémica a IVM en los pacientes tratados se basó en la recopilación de muestras de sangre 4 horas después de cada una de las primeras 3 dosis, después de la quinta y 48 horas después de la última dosis administrada. Este diseño de muestras con tiempos se realizó con el objetivo de medir el pico de IVM plasmático predicho ($C_{m\acute{a}x}$), y estimar así el patrón de eliminación de la droga del cuerpo.

Figure 1: Trial profile

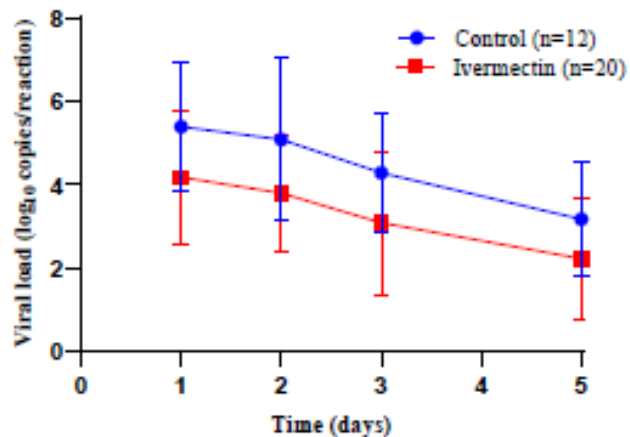


	Control (n = 15)	Ivermectin (n = 30)
Age (year)	38.1 ± 11.7	42.3 ± 12.8
Gender		
Female	5 (33%)	15 (50%)
Male	10 (67%)	15 (50%)
Weight (kilogram)	79.7 ± 14.4	75.3 ± 15.0
Overweight	8 (53%)	6 (20%)
Obesity I	2 (13%)	11 (47%)
Obesity II	1 (7%)	1 (3%)
Obesity III	1 (7%)	1 (3%)
Oxygen saturation <94%	0	1 (3%)
Log viral load (log10 copies/reaction)	5.39 ± 1.56 (n = 12)	4.18 ± 1.60 (n = 20)
Hematology		
White blood cell count (cell/ μ L)	4857 ± 1874	6014 ± 2402
Lymphocyte count (cell/ μ L)	1478 ± 266	1744 ± 747
Biomarkers		
Lactate dehydrogenase (IU/L)	460 ± 117	468 ± 140
Ferritin (mg/dL)	1318 ± 1969	1071 ± 1304
D-dimer (μ g/mL)	1.5 (0.1-2.8)	1.5 (0.5-1.8)
Time from symptoms onset (day)	3.6 ± 1.4	3.5 ± 1.0
Body temperature $\geq 37.5^{\circ}$ C	1 (7%)	4 (13%)
WHO-ordinal scale		
3	13 (87%)	29 (97%)
4	2 (13%)	1 (3%)
Ground glass opacities in thoracic imaging	6 (40%)	14 (47%)
Comorbidities		
Hypertension	3 (20%)	3 (10%)
Diabetes	1 (7%)	6 (20%)
Chronic lung disease/Asthma	1 (7%)	4 (13%)

Tabla 1. Característica basal de la población de estudio. Las variables numéricas se informan como mediana (IQR) media \pm desviación estándar. Las variables categóricas se informan como recuentos (%). Sobrepeso: índice de masa corporal (IMC) 25-29 \cdot 9 kg / m²; Obesidad I: IMC 30-34 \cdot 9 kg / m²; Obesidad II: IMC 35-39 \cdot 9 kg / m²; Obesidad III: IMC > 40 kg / m². No se observaron diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros informados entre los grupos.

La reducción de la carga viral entre el inicio y el día 5 también fue similar entre los grupos (figura 2). Cuando se analizaron los niveles medios de concentración plasmática de IVM en relación con la reducción de la carga, se identificó una correlación positiva significativa, con aquellos pacientes que lograron una concentración media plasmática más alta de IVM, alcanzando mayores reducciones en la carga viral en las secreciones nasofaríngeas ($r: 0,44; p < 0,04$). Esta correlación fue más fuerte cuando la reducción de la carga viral fue relacionada con la exposición a IVM corregida por la carga viral al inicio del estudio ($r: 0,60; p < 0,004$). Los niveles medios de la concentración plasmática de IVM también mostraron una correlación positiva con la tasa de descomposición viral ($r: 0,47, p = 0,02$).

Figure 2. Viral load by quantitative RT-PCR on upper respiratory tract secretions since treatment initiation in patients receiving IVM 0.6 mg/kg/day for 5 days versus untreated controls. Data are mean (SD). Day-1 indicates



baseline measurements.

Según la respuesta antiviral observada, los pacientes tratados se dividieron en dos subgrupos donde 160 ng/ml fue el umbral de la concentración plasmática. La mediana de la C_{max} en este subgrupo fue de 202 ng/ml (IQR: 167-268 ng/ml) en el subgrupo > 160 ng/ml y 109 ng/ml (IQR: 91-141 ng/ml) en el subgrupo < 160 ng/ml ($p < 0.0001$). Para explorar más a fondo esta relación PK / PD, la dinámica de la carga viral y las reducciones entre la línea de base y el día 5, se analizaron en los 2 subgrupos de pacientes tratados con IVM (figura 3a), con una mediana (IQR) de reducción de la carga viral del 42% (31-73) en el grupo de control, 40% (21-46) en los pacientes tratados con concentraciones plasmáticas medias < 160 ng/ml, y 72% (59-77) en el grupo de mayor concentración (Kruskal-Wallis $p = 0.0096$), con una diferencia estadísticamente significativa entre este último y el resto de grupos (figura 3b).

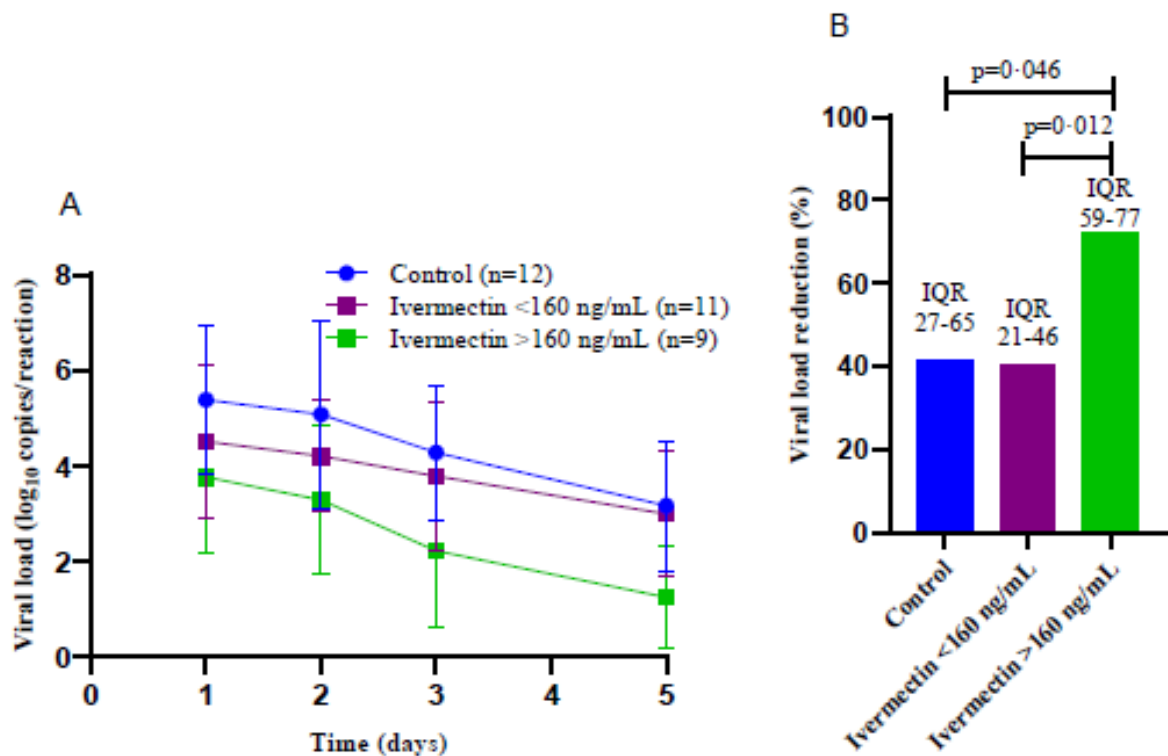
Los efectos inducidos por fármacos sobre la eliminación viral también se evaluaron utilizando las tasas de descomposición viral como criterio de valoración y su relación con la exposición a drogas. La tasa de disminución de la carga viral en pacientes tratados con niveles plasmáticos de IVM > 160 ng/ml fue significativamente mayor (mediana 0,64 d⁻¹) en comparación con lo calculado en el grupo de control no tratado (mediana 0,13 d⁻¹) y también en el subgrupo con < 160 ng/ml de concentración plasmática media (mediana 0,14 d⁻¹) ($p = 0,041$) (figura 4a).

Se observaron diferencias similares en las tasas de caídas comparando controles y subgrupos de pacientes con razón $AUC_{IVM} / AUC_{VI} > 50$ y relación $AUC_{IVM} / AUC_{VI} < 50$ ($p = 0,0006$) (figura 4b).

Se observaron diferencias no significativas en la carga viral basal entre los subgrupos de concentración de IVM. La relación entre la concentración de IVM no se correlacionó con el peso corporal ($r^2 = 0,1$) o índice de masa corporal ($r^2 = 0,07$) entre los 28 pacientes que completaron el tratamiento con IVM.

Se notificaron eventos adversos en 18 (40%) de los 45 pacientes incluidos en el análisis de seguridad, que por el diseño del estudio no fue cegado; 13 (43%) en el grupo IVM y 5 (33%) en el grupo de control (tabla 2). El evento adverso más frecuente y el único experimentado por más de 1 caso en el grupo IVM fue la erupción en 3 (10%) casos (todos leves, autolimitados y que duraron aproximadamente 24 horas); en el grupo de control, episodios únicos de dolor abdominal, mareos, ansiedad, y se informó angustia e hiperglucemia (todas leves). Se produjo un solo evento adverso grave (SAE) en el ensayo que se informó, en un paciente en el grupo IVM con hiponatremia, que ha sido recientemente reconocido en series de casos de casos de COVID-19 y no se ha informado en asociación con IVM.¹⁷ Una se reveló relación entre la concentración sistémica de IVM y los eventos adversos.

Figure 3. Viral load by quantitative RT-PCR on upper respiratory tract secretions since treatment initiation (mean and SD) (A) and viral load reduction between baseline and day-5 (median and IQR) (B) in untreated controls and IVM treated patients discriminated by their median IVM plasma concentrations. All treated patients receiving IVM 0-6 mg/kg/day for 5 days. Day-1 indicates baseline measurements.



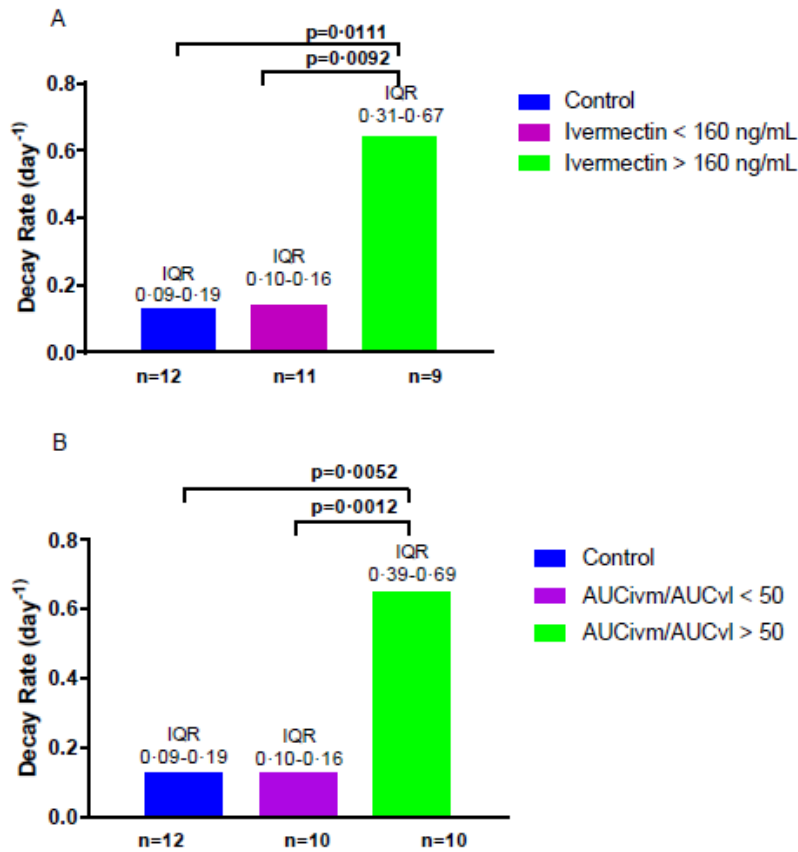


Figure 4. Viral load decay rates by quantitative RT-PCR on upper respiratory tract secretions in untreated controls and IVM treated patients according to median plasma concentrations of IVM (A) and by the ratio between the area under the IVM plasma concentration curve and the area under the viral load curve (AUCivm/AUCvl) (B). Data are expressed as median (IQR).

	Control (n=15)	Ivermectin (n=30)
Patients with AEs	5 (33%)	13 (43%)
Patients with possible/probable related AEs	NA	9
Patients with SAEs	0	1*
Patients with possible/probable related SAEs	0	1
Number of AEs	5	17
Number of possible/probable related AEs	NA	11
Number of AEs Grade 3/4	0	3**

Table 2. Summary of events in safety population. AE: adverse event. SAE: serious adverse event. *: hyponatremia; **: include the SAE (hyponatremia) and ALT and AST elevation, both in the same patient.

Discusión

Los resultados de este ensayo clínico piloto indican una actividad antiviral dependiente de la concentración de IVM en pacientes infectados con SARS-CoV-2, con estadios de enfermedad leves y moderados, tratados dentro de los 5 días desde la aparición de síntomas. Este es el primer ensayo clínico que confirma la actividad *in vitro* previa mostrada en cultivos de células Vero-hSLAM.⁵ La relevancia de las concentraciones plasmáticas de IVM como un indicador de la exposición al fármaco en los sitios de replicación viral, como la mucosa nasofaríngea y los tejidos pulmonares, confirma los modelos teóricos que afirman la necesidad de dosis más altas de lo habitual para lograr actividad antiviral *in vivo*; sin embargo, contradice esas preocupaciones al afirmar que las concentraciones del fármaco no serían alcanzables a dosis con un perfil de seguridad adecuado.^{6,18} Se ha demostrado una gran distribución de IVM en diferentes tejidos de diferentes especies animales. El extenso patrón de distribución de la IVM en el tejido pulmonar ha sido bien caracterizado en el ganado, con una relación tejido pulmonar/plasma de 2,67.¹² Considerando que se han obtenido volúmenes de distribución similares para IVM tanto en el ganado como en los humanos y la disponibilidad sistémica observada en los pacientes tratados en este ensayo clínico, es razonable estimar los niveles medios de IVM > 395 ng/g en tejido pulmonar. Recientemente se ha simulado un patrón similar de distribución de la IVM en el tejido pulmonar utilizando un modelo de PK fisiológico mínimo.¹⁹

El beneficio del efecto antiviral se observó en la reducción de la carga viral entre el inicio y el día⁵ y en las tasas de descomposición viral, solo después de que se pudieron discriminar las mediciones de la concentración plasmática entre los pacientes que alcanzan niveles más altos e identifican una fuerte relación entre la exposición sistémica del fármaco y los parámetros de eliminación viral. Utilizando el umbral de 160 ng/ml para las concentraciones plasmáticas de IVM como indicador de una adecuada exposición al fármaco, se demostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles no tratados incluso después de ajustar la carga viral basal, y aquellos que caen por debajo de 160 ng/ml alcanzan parámetros de eliminación similares al grupo de control. Adicionalmente, pueden derivarse conclusiones relevantes sobre la historia natural del comportamiento de la enfermedad en el grupo de control en este ensayo, lo que demuestra la naturaleza autolimitada de la carga viral en las infecciones por SARS-CoV-2, que en el 22% de los casos ya era extremadamente bajo o indetectable al inicio del estudio; un hallazgo similar a lo que se ha observado en otros ensayos,²⁰ destacando la relevancia del momento adecuado de la implementación del tratamiento antiviral, un tema crítico en el diseño de ensayos clínicos de potenciales terapias antivirales.

Se midieron las concentraciones plasmáticas de IVM > 160 ng/ml en 9 (45%) de los pacientes incluidos en la población de análisis de eficacia. En otro ensayo, se utilizó un régimen de 3 días de 0,6 mg / kg para la actividad mosquitocida y el control de la malaria en adultos, la mediana de C_{max} (IC95%) fue de 119 ng/ml (45-455).⁸ La dieta es una variable clave que afecta la biodisponibilidad oral de la IVM, con un aumento de las concentraciones alcanzadas con la alimentación, principalmente relacionadas con el contenido de grasa de la comida; otras variables probablemente juegan un papel significativo, ya que la IVM se caracteriza por una alta variabilidad farmacocinética intra e interindividual.^{21,22} La interacción entre la IVM con los transportador ABC, como la Glicoproteína P,²³ como la modulación de la actividad de la glicoproteína P intestinal luego de la administración oral, es bien conocida. Por lo tanto, una variable constitutiva y/o inducida del nivel

de expresión y la actividad de la glicoproteína P intestinal en los pacientes tratados, puede haber contribuido a la gran variabilidad observada en el patrón de absorción de IVM y en la exposición sistémica.

La seguridad y eficacia de la IVM en dosis altas son un tema de investigación en vista de su papel potencial, aumentando la utilidad clínica en nuevas indicaciones, como es el caso de la malaria y también apuntando a dosis fija simplificadas en lugar de estrategias basadas en el peso como en las campañas de Administración Masiva de Drogas contra diferentes Enfermedades Tropicales Desatendidas. Aunque se necesita más información, este ensayo agrega evidencia sobre la seguridad de los regímenes de dosis alta de IVM durante varios días, sin hallazgos inesperados.

Las limitaciones de este ensayo incluyen un tamaño de muestra pequeño para detectar resultados clínicos más allá de la actividad antiviral, siendo esta última la pregunta crítica para la que se diseñó este ensayo. El hallazgo de 2 distintas poblaciones con respecto a las concentraciones sistémicas medias de IVM a pesar de la dosificación basada en el peso corporal y la indicación de administrar los comprimidos del fármaco con las comidas. La falta de un registro adecuado del contenido real de las comidas ingeridas en torno a la ingesta de cada tratamiento puede agregar una fuente de variación a los perfiles de plasma IVM observados entre los pacientes tratados.

La evaluación del efecto de los fármacos candidatos contra los virus que causan enfermedades respiratorias agudas infecciosas se ven obstaculizadas por varios aspectos las relaciones huésped-patógeno, incluidos los períodos de incubación, el control inmunológico relativamente rápido de la replicación viral y alta variabilidad en las puntuaciones de los síntomas entre los pacientes.²⁵ Por esa razón, los componentes clave para los criterios de valoración adecuados en estos ensayos son medidas cuantificables sensibles de la causa subyacente de la enfermedad como la RT-PCR cuantitativa con un amplio rango dinámico, para controlar la alta variabilidad interindividual en la infección natural.²⁶ Aún en este ensayo, la adición de una evaluación integrada que toma en cuenta los parámetros farmacocinéticos del fármaco fue necesaria para identificar la posible utilidad clínica de la IVM en las infecciones por SARS-CoV-2. En pacientes tratados con IVM, se asociaron cocientes $AUC_{Ivm} / AUC_{VI} > 50$ con tasas de descomposición viral significativamente más altas. Como se ha propuesto en un modelo de influenza para evaluación de fármacos candidatos antivirales²⁵, las tasas de desintegración viral demostraron ser un parámetro crítico de la actividad antiviral. Además, como se ha demostrado claramente para las infecciones virales agudas, el inicio temprano del tratamiento juega un papel fundamental en la actividad antiviral^{26,27}. La relevancia de estos hallazgos queda por confirmar en ensayos con criterios de valoración clínicos. Más allá de los aspectos clínicos de la enfermedad, la reducción de la carga viral podría influir en la infectividad, aunque hay datos contradictorios sobre la relación entre la carga de diseminación viral y la infectividad.²⁸

La reutilización de fármacos ha centrado gran atención en la búsqueda de tratamientos viables en el contexto de la pandemia de COVID-19, lo que permite reducir el tiempo y el costo de desarrollo. Además, el uso de los compuestos antivirales basados en el huésped se ha propuesto como una estrategia alternativa a los antivirales directos, que podría superar las limitaciones derivadas de la fármaco-resistencia o mutaciones virales.²⁹ El mecanismo antiviral propuesto de la IVM es a través de su capacidad para inhibir la importación nuclear de proteínas virales mediado por el heterodímero IMP $\alpha / \beta 1^5$, y también se ha sugerido que IVM podría promover mecanismos de

defensa como la piroptosis en células epiteliales infectadas (muerte celular programada proinflamatoria, de células infectadas por parásitos intracelulares).³⁰

En resumen, nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que la IVM tiene una actividad antiviral concentración dependiente contra el SARS-CoV-2 y proporciona información sobre el tipo de evaluaciones a ser consideradas en la evaluación de medicamentos antivirales para el control del COVID-19. Se deben desarrollar ensayos de seguimiento para confirmar nuestros hallazgos e identificar la utilidad clínica de la IVM como intervención única o en combinación con otras herramientas para el control del brote pandémico en curso.

REFERENCIAS

1. National Institutes of Health. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed 06oct2020. Available from: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
2. World Health Organization. Summary of global update on implementation of preventive chemotherapy against neglected tropical diseases in 2019. *Weekly Epidemiol Record*. 2020;39(95):469-75
3. World Health Organization. World health organization model list of essential medicines. In: *Mental and Holistic Health: Some International Perspectives*. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.; 2019. p. 119–34.
4. Jans DA and WKM. Ivermectin as a broad-spectrum host-directed antiviral: The real deal? *Cell*. 2020;2017(4):52–3.
5. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antivir Res*. 2020;178:104787. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104787.
6. Bray R, Rayner CR, Noël F, Jans D, Wagstaff K. Ivermectin and COVID-19: A report in *Antiviral Research*, widespread, and FDA warning, two letters to the editor and the authors' responses. *Antivir Res*. 2020;178: 104805. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104805.
7. Navarro M, Camprubí D, Requena-Méndez A, Buonfrate D, Giorli G, Kamgno J, et al. Safety of high-dose ivermectin: A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(4):827–34.
8. Smit MR, Ochomo EO, Aljanyoussi G, Kwambai TK, Abong'o BO, Chen T, et al. Safety and mosquitocidal efficacy of high-dose ivermectin when co-administered with dihydroartemisinin-piperazine in Kenyan adults with uncomplicated malaria (IVERMAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(6):615–26.
9. Han MS, Byun J-H, Rim JH. RT-PCR for SARS-CoV-2: quantitative versus qualitative. *Lancet Infect Dis*. 2020;S1473-3099(20)30424-2. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30424-2. Online ahead of print.

10. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):550–76.
11. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611–22.
12. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M, et al. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Vet Parasitol.* 2000;87(4):327–38.
13. Gibaldi M, Perrier D. 1982. *Pharmacokinetics*. 2nd ed. Informa Healthcare., New York U, editor.
14. Birkett MA, Day SJ. Internal pilot studies for estimating sample size. *Stat Med.* 1994;13(23-24):2455–63.
15. Cocks K, Torgerson DJ. Sample size calculations for pilot randomized trials: A confidence interval approach. *J Clin Epidemiol.* 2013;66(2):197–201.
16. Cohen J. 1988. *Statistical Power analysis for the Behavioral sciences*. 2nd ed. Hillsdale NLE, editor.
17. Yousaf XZ, Al-shokri SD, Al-soub H, Mohamed MFH, Rj A, Jt H, et al. COVID-19- associated SIADH : a clue in the times of pandemic ! *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020;882–5.
18. Chaccour C, Hammann F, Ram S. Editorial Ivermectin and COVID-19 : Keeping Rigor in Times of Urgency. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;102(6):1156–7.
19. Jermain B, Hana PO, Cao Y, Lifschitz A, Lanusse C, Rao GG. Development of a Minimal Physiologically-Based Pharmacokinetic Model to Simulate Lung Exposure in Humans Following Oral Administration of Ivermectin for COVID-19 Drug Repurposing. *J Pharm Sci.* 2020;1–5.
20. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 2020;395(10236):1569–78.
21. Muñoz J, Ballester MR, Antonijoan RM, Gich I, Rodríguez M, Colli E, et al. Safety and pharmacokinetic profile of fixed-dose ivermectin with an innovative 18mg tablet in healthy adult volunteers. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(1):e0006020.
22. Guzzo C a, Furtek CI, Porras AG. of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *J Clin Pharmacol.* 2002;1122–33.
23. Lespine A, Martin S, Dupuy J, Roulet A, Alvinerie M. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein : Structure – affinity relationship. *Eur J Pharm Sci.* 2006;0:84–94.
24. Ballent M, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep : itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007;242–8.
25. Vegvari C, Hadjichrysanthou C, Cauët E, Lawrence E, Cori A, De Wolf F, et al. How can viral dynamics models inform endpoint measures in clinical trials of therapies for acute viral infections? *PLoS One.* 2016;11(7):1–13.

26. Vegvari C, Cauët E, Hadjichrysanthou C, Lawrence E. Using Clinical Trial Simulators to Analyse the Sources of Variance in Clinical Trials of Novel Therapies for Acute Viral Infections. *PLoS One*. 2016;1–18.
27. Arabi Y, Assiri AY, Assiri AM, Balkhy H, Bshabshe A, Jeraisy M, et al. Interferon Beta- 1b and Lopinavir–Ritonavir for Middle East Respiratory Syndrome. *N Engl J Med*. 2020;1–12.
28. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*.2020;581(7809):465–9.
29. Alonso DF, Farina HG. Repurposing of host-based therapeutic agents for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a link between antiviral and anticancer mechanisms? *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(3):5–7.
30. Draganov D, Gopalakrishna-pillai S, Chen Y, Zuckerman N, Moeller S, Wang C, et al. Modulation of P2X4 / P2X7 / Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Sci Rep*. 2015;(May):1–17

GCP