

Efecto del tratamiento temprano con ivermectina sobre la carga viral, los síntomas y la respuesta humoral en pacientes con COVID-19 no grave: un ensayo clínico piloto, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo

Carlos Chaccour^{a,b,c,*}, Aina Casellas^{a,d}, Andr_és Blanco-Di Matteo^b, Iñigo Pineda^b, Alejandro Fernandez-Montero^b, Paula Ruiz-Castillo^a, Mary-Ann Richardson^a, Mariano Rodríguez-Mateos^b, Carlota Jord_an-Iborra^b, Joe Brew^e, Francisco Carmona-Torre^{b,f}, Miriam Gir_aldez^b, Ester Laso^b, Juan C. Gabald_on-Figueira^b, Carlota Dobaño^a, Gemma Moncunill^{a,g}, Jos_e R. Yuste^b, Jose L. Del Pozo^b, N.Regina Rabinovich^{a,g}, Verena Schœningh^h, Felix Hammann^h, Gabriel Reina^{b,g}, Belen Sadaba^b, Mirian Fern_andez-Alonso^b

a ISGlobal, Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

b Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

c Ifakara Health Institute, Ifakara, Tanzania

d Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

e Databrew, Gainesville, FL, United States

f IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain

g Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA, United States

h Clinical Pharmacology and Toxicology, Department of General Internal Medicine, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Switzerland

EclinicalMedicine, <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100720>, 19 de enero, 2021

RESUMEN

Antecedentes. La ivermectina inhibe la replicación del SARS-CoV-2 in vitro en concentraciones que no se pueden alcanzar fácilmente con las dosis aprobadas actualmente. Existe evidencia limitada para apoyar su uso clínico en pacientes con COVID-19. Realizamos un ensayo piloto, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo para evaluar la eficacia de una sola dosis de ivermectina para reducir la transmisión del SARS-CoV-2, cuando se administra poco después del inicio de la enfermedad.

Métodos. Fueron inscriptos pacientes consecutivos con COVID-19 no grave y sin factores de riesgo de enfermedad complicada, que asistieron al Departamento de Urgencias de la Clínica de la Universidad de Navarra, entre el 31 de julio y el 11 de septiembre del 2020. Todas las inscripciones ocurrieron dentro de las 72 horas del inicio de la fiebre o tos. Los pacientes fueron aleatorizados 1: 1 para recibir ivermectina, 400 mcg/ kg, dosis única (n = 12) o placebo (n = 12). La medida del resultado primario fue la proporción de pacientes con ARN del SARS-CoV-2 detectable por PCR de un hisopado nasofaríngeo al día 7 después del tratamiento. El resultado primario fue apoyado por la determinación de la carga viral y la infectividad de cada muestra. Las diferencias entre la ivermectina y el placebo se calcularon mediante la prueba exacta de Fisher y se presentaron como una razón de riesgo relativo. Este estudio está registrado en ClinicalTrials.gov: NCT04390022.

Hallazgos. Todos los pacientes reclutados completaron el ensayo (edad media, 26 [IQR 19-36 en la ivermectina y 21-44 en los controles] años; 12 [50%] mujeres; El 100% tenía síntomas en el momento del reclutamiento, el 70% informó dolor de cabeza, el 62% informó fiebre, el 50% informó malestar general y el 25% informó tos). El día 7, no hubo diferencia en la proporción

de pacientes PCR positivos (RR 0.92, IC 95%: 0.77 1.09, $p = 1.0$). El grupo de ivermectina tuvo resultados no estadísticamente significativos de cargas virales más bajas en el día 4 ($p = 0.24$ para el gen E; $p = 0.18$ para el gen N) y el día 7 ($p = 0.16$ para el gen E; $p = 0.18$ para gen N) después del tratamiento, así como títulos de IgG más bajos el día 21 después del tratamiento ($p = 0.24$). Los pacientes del grupo de la ivermectina se recuperaron antes de la hiposmia / anosmia (76 frente a 158 días-paciente; $p < 0,001$).

Interpretación. Entre los pacientes con COVID-19 no grave y sin factores de riesgo de enfermedad grave que reciben una dosis única de 400 mcg/ kg de ivermectina, dentro de las 72 h de la aparición de fiebre o tos, no hubo diferencia en la proporción de positivos por PCR. Sin embargo, hubo una marcada reducción de la anosmia/ hiposmia autoinformadas, una reducción de la tos y una tendencia a bajar las cargas virales y los títulos de IgG, lo que justificaría la evaluación en ensayos más grandes.

Investigación en contexto

Evidencia antes de este estudio

La ivermectina es un fármaco antiparasitario de amplio espectro con conocidas propiedades antivirales. El 3 de abril de 2020, Caly y colegas publicaron evidencia de experimentos in vitro que muestran que la ivermectina puede inhibir la replicación del SARS-CoV-2 a concentraciones micromolares. Esto ha dividido a la comunidad científica en dos opiniones, un grupo pide evitar la inversión y el esfuerzo en un fármaco que probablemente fracasará en los ensayos clínicos, y otro grupo que pide una ampliación rápida incluso en ausencia de seguridad y eficacia probadas para la posible indicación de COVID-19. Desde abril de 2020, ha habido una gran cantidad de ensayos observacionales, series de casos y análisis ecológicos que sugieren una eficacia potencial de la ivermectina contra el COVID-19. Sin embargo, muy pocos informes de ensayos clínicos controlados aleatorios. La evidencia emergente de estudios realizados en Bangladesh y Argentina apuntan hacia un uso clínico potencial.

Valor agregado de este estudio

Este ensayo piloto, aleatorizado, controlado con placebo y doble ciego no mostró una reducción en la proporción de PCR-positivas en pacientes a siete días después del tratamiento con ivermectina; sin embargo, muestra una reducción de la anosmia / hiposmia autoinformadas y una (no estadísticamente significativa) tendencia a disminuir la carga viral y disminuir y títulos de IgG que presumiblemente reflejan una enfermedad más leve.

Implicaciones de toda la evidencia disponible

La señal positiva encontrada en este piloto, junto con la evidencia emergente de modelos animales y otros ensayos clínicos, justifica la realización de ensayos más grandes con ivermectina para el tratamiento del COVID-19 temprano.

1. Introducción

Al 21 de diciembre de 2020, ha habido más de 70 millones de casos y 1.6 millones de muertes por COVID-19 en todo el mundo [1]. Aunque el umbral es difícil de predecir con precisión [2], la propagación del SARS-CoV-2 es poco probable que se detenga antes de que al menos el 50%

de la población haya ganado inmunidad, ya sea por vacunación o recuperándose de una infección adquirida naturalmente [3]. Ahora hay vacunas candidatas prometedoras avanzando a la aprobación regulatoria de emergencia [4], pero hay una proyección de un retraso en el acceso global al nivel requerido de la población para que tenga impacto en la trayectoria de la pandemia. Mientras se realizan esfuerzos para desarrollar opciones de tratamiento, se ha prestado relativamente menos atención a evaluar el bloqueo de la transmisión basada en drogas o las estrategias de reducción de la transmisión. Estas estrategias consistirían en administrar un fármaco, con el objetivo de reducir la transmisión ulterior por aquellos infectados, y que podría servir para reducir la carga sobre el sistema de salud y ganar tiempo hasta que las vacunas se prueben completamente y se amplíen.

La ivermectina es un fármaco antiparasitario ampliamente utilizado con conocida eficacia contra varios virus de ARN de una sola cepa [5-7]. Caly y colegas informaron de la inhibición in vitro de la replicación del SARS-CoV-2 utilizando concentraciones micromolares de ivermectina [8]. Estos hallazgos, junto con la evidencia de observación temprana y la evidencia ecológica, impulsaron a varios países latinoamericanos a incluir la ivermectina como parte de la política nacional para el tratamiento del COVID-19 [9].

Al 21 de diciembre de 2020, hay 45 estudios que evalúan la eficacia de ivermectina para tratar o prevenir el COVID-19 registrado en ensayos clínicos.gov, y 74 ensayos registrados en la Plataforma Internacional de Registro de Ensayos Clínicos de la OMS ([https:// apps.who.int/trialsearch/](https://apps.who.int/trialsearch/)) de los cuales al menos 14 ya se han completado. Aunque algunos estudios observacionales y de casos y controles, así como pequeños estudios clínicos aleatorizados sugieren una utilidad potencial [10-13], todavía hay escasez de ensayos controlados aleatorios robustos para informar adecuadamente las decisiones políticas.

Este ensayo fue diseñado como piloto para evaluar si la dosis máxima aprobada de ivermectina en Europa podría tener un impacto sobre la transmisión del SARS-CoV-2 cuando se administra poco después del inicio de la enfermedad.

2. Métodos

Este fue un ensayo clínico piloto, doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado, de un solo centro, de superioridad, de brazos paralelos, que comparó una dosis única de ivermectina con placebo, en pacientes con COVID-19 no grave y sin factores de riesgo. Se publicó el protocolo del ensayo [14], la última versión del protocolo y plan de análisis estadístico está disponible como archivos complementarios. El protocolo fue aprobado por el Comité Nacional de Ética para la Investigación de Medicamentos (Hospital Puerta de Hierro Majadahonda) y por la Agencia Española de Medicamentos y Dispositivos médicos. Todos los procedimientos se realizaron de conformidad con la última revisión de la Declaración de Helsinki y Buenas Prácticas Clínicas. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado verbal en el momento de la inscripción seguido por el consentimiento escrito una vez que su aislamiento fue levantado en de acuerdo con las recomendaciones de la EMA: "Orientación sobre la gestión de ensayos clínicos durante la pandemia de COVID-19 (coronavirus) Versión 2 (27/03/2020)" [15]. Este estudio está registrado en ClinicalTrials.gov: NCT04390022. Este estudio fue financiado por ISGlobal y la Clínica de la Universidad de Navarra. Las fuentes de financiación no tuvieron ningún papel en el diseño, análisis o decisión de publicar los resultados de este estudio.

2.1. Pacientes

Se inscribieron pacientes ambulatorios consecutivos que acuden al Departamento de Urgencias de la Clínica de la Universidad de Navarra (Pamplona, España) con síntomas compatible con COVID-19, de no más de 72 h de fiebre o tos y con una PCR positiva para SARS-CoV-2. Pacientes con IgG contra SARS-CoV-2 positiva contra SARS-CoV-2, comorbilidades consideradas como factores de riesgo para enfermedad grave o neumonía por COVID-19 al inicio del estudio, se excluyeron (Los criterios de elegibilidad detallados se proporcionan en el protocolo -Suplementario).

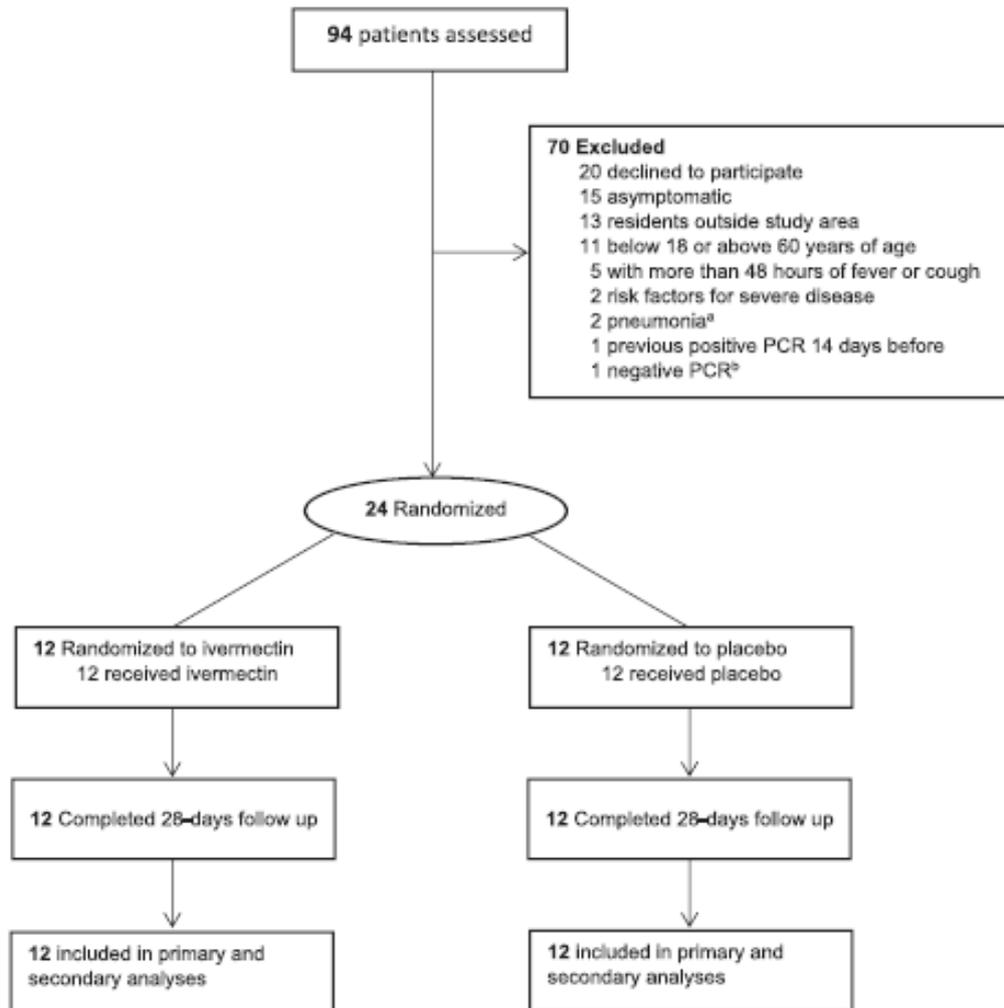


Fig. 1. Enrollment and patient flow. ^aOne presented with pneumonia in the ER and one had a compatible X-ray during screening. ^bFormally screened based on epidemiological and clinical suspicion but had a negative PCR.

2.2. Diseño y supervisión del estudio

El ensayo se realizó en el área metropolitana de Pamplona (Navarra, España). Los pacientes se inscribieron entre el 31 de julio y el 11 de septiembre del 2020, y se aleatorizaron en una proporción de 1: 1 a ivermectina (400mcg / kg) dosis oral única o placebo. La secuencia de aleatorización fue generada por computadora para la estadística del ensayo, utilizando bloques de cuatro para asegurar el equilibrio. La asignación fue realizada por el investigador asistente utilizando sobres opacos. Los comprimidos de placebo no coincidían con la ivermectina en apariencia, por lo tanto, para que el equipo del ensayo clínico permaneciera

ciego, el tratamiento se administró bajo supervisión directa por una enfermera no participante que recogió los frascos opacos directamente de la farmacia y administró el contenido detrás, a puertas cerradas. El equipo del ensayo clínico no tuvo contacto con el producto de investigación. Hubo un reclutamiento lento debido a una fuerte reducción en la transmisión local durante 10 semanas después del bloqueo de marzo-abril del 2020, el protocolo fue modificado el 2 de septiembre para ampliar los criterios de inclusión de 48 a un máximo de 72 horas de tos o fiebre.

El objetivo principal fue determinar la eficacia de una dosis única de ivermectina, administrada a pacientes con COVID-19 no grave de bajo riesgo, en las primeras 72 h después de la aparición de fiebre o tos, para reducir el avance transmisión.

2.3. Seguimiento clínico, de laboratorio y virológico

Las evaluaciones al enrolamiento, y en los días 4, 7, 14, 21 y 28 post-tratamiento, incluyeron: informe general de síntomas, exploración física (incluida la frecuencia respiratoria, la saturación de oxígeno en sangre y la auscultación del tórax) y eventos adversos. A todos los pacientes se les pidió que completaran un diario en línea de síntomas desde el día 1 al 28 después del tratamiento. En la inscripción, así como en los días 7 y 14 se obtuvieron muestras de sangre para evaluar hemograma completo, proteína C reactiva, procalcitonina, ferritina, creatininfosfoquinasa, deshidrogenasa láctica, troponina T, dímero D, IL-6 y función renal.

Se tomó un hisopado nasofaríngeo para PCR del SARS-CoV-2 en el momento de la inscripción y los días 4, 7, 14 y 21 después del tratamiento. Por consistencia, estas muestras fueron recolectadas por tres médicos usando la misma técnica. Todas las muestras fueron procesadas por PCR para los genes N y E de SARS-CoV-2 (Real Time PCR SARS-CoV-2, Vircell SLU, Granada, España). Para cada muestra, la carga viral se calculó utilizando una curva de referencia estándar (EDX Sars-Cov-2, Exact Diagnostics LLC, Fort Worth Texas).

Además, todas las muestras del día 4 posterior al tratamiento se cultivaron en Células Vero durante 7 días, después de lo cual se evaluó el efecto citopático y PCR realizada en el sobrenadante libre de células recolectado. Si la PCR del sobrenadante era positiva el día 4, el procedimiento era repetido en las muestras de ese paciente para el día 7. Una serología semicuantitativa para IgG contra SARS-CoV-2 (COVID-19 VIRCLIA IgG monotest, Vircell SLU, Granada, España) se realizó en muestras de todos los pacientes el día 21 después del tratamiento.

2.4. Medidas de resultado

La medida de resultado primaria fue la proporción de pacientes con ARN del SARS-CoV-2 detectable mediante PCR de un hisopado nasofaríngeo al día 7 después del tratamiento.

Los resultados secundarios preespecificados relevantes incluyeron la carga viral en los días 4, 7, 14 y 21 después del tratamiento; proporción de pacientes con síntomas (particularmente fiebre y tos) en los días 4, 7, 14 y 21 después del tratamiento, así como la proporción de pacientes que progresan a una enfermedad grave o muerte durante el ensayo; proporción de pacientes con seroconversión el día 21 después del tratamiento y la proporción de eventos adversos relacionados al fármaco.

2.5. Justificación del tamaño de la muestra

En COVID-19, la carga viral alcanza su punto máximo justo antes o al inicio de los síntomas [16,17] y la mayoría de los casos secundarios (contagios) ocurren antes del día cinco después de los síntomas [18]. Este ensayo piloto fue diseñado para evaluar el uso de ivermectina para reducir la transmisión. Con el objetivo de reducir la transmisión hacia adelante, un tamaño del efecto robusto en la proporción de positivos por PCR al día siete después del tratamiento serían necesarios para tener un impacto en la salud pública. Una reducción de al menos el 50% en la proporción de positivos fue considerado de valor potencial.

El tamaño de la muestra se basó en la comparación de dos proporciones y fue calculado para tener una potencia del 80%, a un nivel de significancia del 5%, para detectar una reducción del 50% (100 frente al 50%) en la proporción de participantes con PCR positiva el día 7 post-tratamiento. La cifra de 100% de positividad de la PCR en el día 7 se basó en la experiencia con pacientes ambulatorios con COVID-19 en la Clínica Universidad de Navarra durante la primera ola de marzo-mayo de 2020. El resultado de la infectividad se apoyó mediante la evaluación de cambios en la carga viral y la infectividad en cultivos celulares.

2.6. análisis estadístico

Los análisis descriptivos utilizaron frecuencia y porcentaje (basados en el tamaño muestral no faltante) para variables cualitativas y mediana, rango intercuartílico y n (tamaño de muestra no faltante) para variables cuantitativas.

Para el objetivo principal, la proporción de participantes con resultados positivos se calculó la PCR en el día siete después del tratamiento. Se compararon las dimensiones entre los brazos del estudio utilizando la prueba exacta de Fisher y presentado como un cociente de riesgo relativo (RR) con su correspondiente 95% intervalo de confianza (IC). En el análisis de los síntomas reportados por los pacientes (diario de síntomas), los datos faltantes se transfirieron de los últimos datos disponibles. La significancia se fijó en 0,05. El análisis se llevó a cabo utilizando Stata (StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Versión 16. College Station, TX: StataCorp LLC).

Se produjeron diagramas de caja y diagramas de barras para la descripción de y variables cualitativas, respectivamente. Para facilitar la lectura de las figuras, los valores de carga viral se transformaron logarímicamente. Los gráficos se produjeron en R versión 4.0.2 (R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computación, Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020) con el paquete ggplot2 (H. Wickham, ggplot2: Elegants Graphics para análisis de datos, Springer-Verlag Nueva York, 2016).

Los datos de carga viral se sincronizaron antes del análisis contando los días desde la aparición de cualquier síntoma y, si el día de la infección no se conocía, se supuso un tiempo medio de incubación de 5 días [19]. La carga viral máxima (Cmax) y el tiempo hasta la carga viral máxima (Tmax) fueron determinado directamente de los perfiles. El área bajo la curva de carga viral se calculó utilizando la regla trapezoidal, a partir del momento supuesto de infección, a la última muestra (AUCobs). La duración del tiempo por encima de un umbral de ciclo (Ct) de 35 se derivó directamente de perfiles o linealmente de perfiles extrapolados, si el último valor Ct registrado no estaba por debajo del límite.

2.7. Análisis post hoc

La mediana de la carga viral, en todos los tiempos de muestreo, y la mediana de los títulos de IgG, entre los grupos de estudio, se compararon mediante una prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Se calculó el efecto en el grupo de estudio sobre la presencia de síntomas utilizando modelos de regresión logística de efectos mixtos con el sujeto como intercepción aleatoria. Estos modelos se ajustan por día de seguimiento (ya que se espera que los síntomas desaparezcan con el tiempo) y por la duración de síntomas antes de la inscripción (como un indicador del inicio de la enfermedad). Para evaluar el efecto potencial del grupo de estudio sobre la progresión de los síntomas, la interacción entre el brazo del estudio y el día de seguimiento también se incluyó en los modelos. Se estudiaron tres modelos para aquellos resultados para los que se observaron diferencias entre tratamientos: cualquier síntoma, anosmia o hiposmia y tos. Además, el efecto observado de la ivermectina sobre la anosmia / hiposmia se evaluó en un subanálisis por sexo.

El peso adiposo de los participantes en el grupo de ivermectina fue calculado con el método descrito por Gomez-Ambrosi et al. [20]. Esta información se utilizó para estimar la dosis de ivermectina por peso adiposo recibido y fue graficado contra el último día del informe de anosmia / hiposmia.

3. Resultados

3.1. Características de los pacientes

De 94 pacientes evaluados, 50 no cumplieron con los criterios de elegibilidad, 20 se negaron a participar y 24 fueron asignados al azar. Todos los pacientes aleatorizados recibieron el producto del estudio correspondiente y completaron 28 días de seguimiento (**fig. 1**). Las características basales de los pacientes en ambos grupos se presentan en la **Tabla 1**.

Hubo una mayor proporción de mujeres en el grupo placebo (58 frente a 42%). Las características demográficas y basales de la enfermedad de los participantes de ambos grupos se presentan en la **Tabla 1**. En general, el 66% de los pacientes presentaron fiebre percibida u objetiva, el 25% presentó tos, el 70% presentó dolor de cabeza y el 58% presentó mialgias o malestar general sin diferencias notables, entre grupos. La mediana de inicio más temprano de cualquier síntoma antes del tratamiento fue de 24 horas para el grupo de ivermectina (rango intercuartílico, 24 a 48 horas) y 48 horas para el grupo placebo (rango intercuartílico, 36 a 48 horas). Al inicio del estudio, no hubo diferencias en los signos vitales, marcadores de inflamación o hemograma completo entre los grupos (**Tabla 1**).

3.2. Variable principal

No hubo diferencia en la proporción de pacientes con PCR positiva el día 7 después del tratamiento, 12/12 (100%) pacientes tuvieron una PCR positiva para gen N en ambos grupos. Para el gen E, 11/12 (91%) en la ivermectina y 12/12 (100%) en el grupo placebo tuvieron una PCR positiva (RR 0.92, 95% CI: 0.77-1.09, p = 1.00).

3.3. Carga viral

Los genes E y N tuvieron resultados comparables en todos los momentos. Los pacientes en ambos grupos de estudio tenían una carga viral similar antes del tratamiento con rango mediano e intercuartílico para los genes E y N en los mismos órdenes de magnitud (**Fig. 2 y Tabla S1**). Aunque hubo una constante superposición en rangos intercuartílicos y rangos completos en todos los puntos, la carga viral media para ambos genes fue menor en los días 4 y 7 post tratamiento en el grupo de la ivermectina, con diferencias que aumentan de 3 veces menor en el día 4 ($p = 0.24$ para el gen E; $p = 0.18$ para el gen N) para alrededor de 18 veces menor en el día 7 ($p = 0.16$ para el gen E; $p = 0.18$ para gen N) (**Fig.2 y Tabla S1**). Una tendencia similar se mantuvo para la carga viral en los días 14 y 21, con valores de los pacientes en el grupo de ivermectina, consistentemente más bajo para al menos uno de los genes, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa en ningún punto (**Fig. 2 y Tabla S1**). Los valores de los umbrales de ciclo tenían un comportamiento similar (Figura S1). El resumen de las estadísticas de la cinética viral se proporciona en la **Tabla S2**.

Table 1
Baseline characteristics of patients by group.

	Ivermectin (n = 12)	Placebo (n = 12)
Age, median (IQR)[range] (years)	26 (19–36) [18–54]	26 (21–44) [18–54]
Sex, No. (%)		
Female	5 (42%)	7 (58%)
Male	7 (58%)	5 (42%)
Body mass index, median (IQR) [range] kg/m ²	23.5 (19.6–27.8) [18.6–29.9]	22.9 (21.0–24.8) [19.3–29.9]
Symptoms		
Any, No. (%)	12 (100%)	12 (100%)
Fever, No. (%)	7 (58%)	9 (75%)
Cough, No. (%)	4 (33%)	2 (17%)
Headache, No. (%)	7 (58%)	10 (83%)
Myalgia/general malaise, No. (%)	8 (67%)	6 (50%)
Earliest start of any symptom ^a , median, (IQR) [range]	24 (24–48) [18–120]	48 (36–48) [24–72]
Earliest start of fever ^{a*} , No, median, (IQR) [range]	24 (12–24) [12–24], n = 7	24 (24–48) [4–48], n = 9
Earliest start of cough ^a , No, median, (IQR) [range]	24 (16–36) [8–48], n = 4	10 (8–12) [8–12], n = 2
Vital signs		
Systolic Blood pressure, median, (IQR), mmHg	114 (113–117)	129 (116–134) ^b
Diastolic blood pressure, median, (IQR), mmHg	76 (72–80)	79 (77–85)
Heart rate, median (IQR), bpm	83 (77–99)	90 (81–100)
Respiratory rate, median (IQR), bpm	14 (12–17)	14 (12–15)
Temperature, median (IQR), °C	36.8 (36.4–37.0)	36.9 (36.5–37.0)
Oxygen saturation, median (IQR),%	97 (96–98)	98 (97–100)
Viral load		
Gene E, No. (IQR), copies/ml	1.7·10 ⁷ (5.9·10 ⁶ –3.9·10 ⁸)	2.7·10 ⁷ (8.3·10 ⁵ –4.2·10 ⁸)
Gene N, No. (IQR), copies/ml	3.7·10 ⁸ (1.8·10 ⁷ –9.3·10 ⁹)	3.3·10 ⁸ (5.8·10 ⁷ –6.7·10 ⁹)
Inflammatory markers		
CRP, median (IQR), mg/dL [normal value]	0.3 (0.2–0.8) [<0.5]	0.3 (0.2–0.6) [<0.5]
Ferritin, median (IQR), mg/dL [normal value]	165.0 (95.8–241.3) [30–400]	156.1 (103.1–223.0) [30–400]
IL-6, median (IQR), pg/mL [normal value]	6.5 (5.1–9.6) [<7]	4.5 (3.0–6.5) [<7]
D-Dimer, median (IQR), ng/mL [normal value]	295 (270–420) [150–500]	280 (270–315) [150–500]
Full blood count		
Red blood cells, median (IQR), 10 ¹² /L	5.05 (4.62–5.55)	5.07 (4.67–5.45)
Hemoglobin, median (IQR), g/dL	15.3 (13.8–16.0)	15.2 (13.7–15.8)
Platelets, median (IQR), 10 ⁹ /L	194 (167–216)	205 (179–247)
White blood cells, median (IQR), 10 ⁹ /L	4.7 (4.3–6.3)	4.4 (3.7–5.9)
Neutrophils, median (IQR),%	52.4 (45.6–65.1)	53.4 (43.9–62.2)
Lymphocytes, median (IQR),%	29.5 (18.5–7.9)	28.7 (20.8–39.9)

^a Hours before dosing

^b The slightly higher median systolic blood pressure in the placebo group at baseline was not seen in subsequent study visits and was judged as non-clinically significant, see table S3 for the evolution of all vital signs throughout the study, *Reported or measured fever. IQR: interquartile range

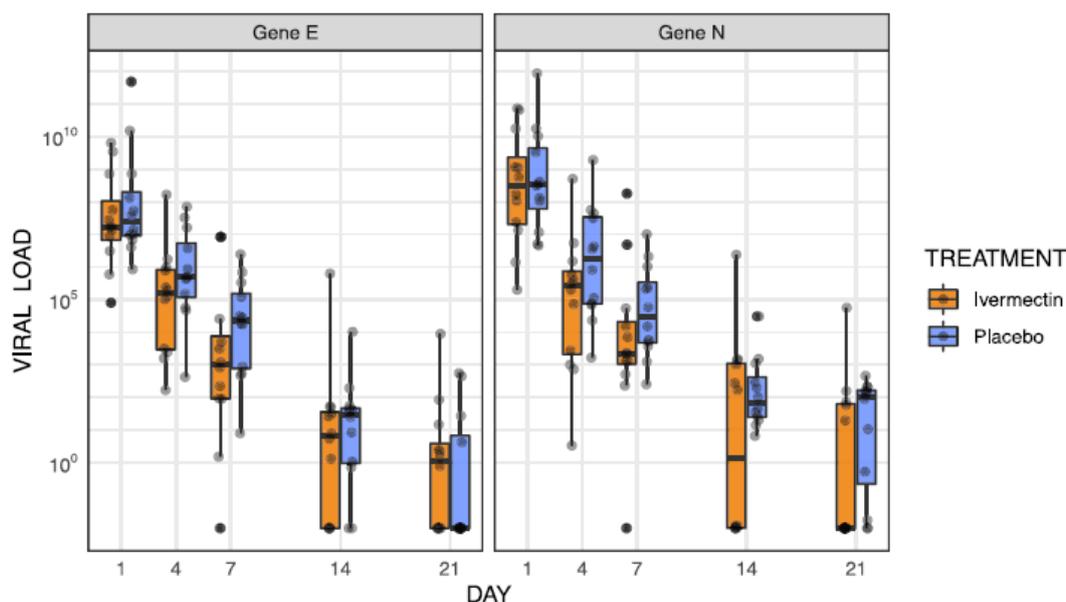


Fig. 2. Viral load evolution by study arm. Viral load values were log-transformed. The boxes show the interquartile range. Dots represent each individual value.

3.5. Síntomas

Hubo buen cumplimiento del cuestionario online diario, con informes de 282 pacientes-días (84%) y 295 informes de pacientes-días (88%) en el grupo de ivermectina y placebo respectivamente (**Fig. S2**).

Los pacientes del grupo de ivermectina informaron menos días-paciente de cualquier síntoma que los del grupo placebo (171 frente a 255 días-paciente). Esta diferencia se debe principalmente a dos síntomas, anosmia/ hiposmia y tos. Los pacientes en el grupo de ivermectina informaron 50% menos anosmia/ hiposmia que los del grupo placebo (76 vs 158 días-paciente de anosmia / hiposmia). El grupo de la ivermectina también informó un 30% menos de tos (68 frente a 97 pacientes-días de tos) (**Fig. 3**). No hubo diferencias importantes entre la ivermectina y el placebo en los pacientes-días notificados de fiebre (12 frente a 12), malestar general (51 vs 61), dolor de cabeza (34 vs 38) o congestión nasal (91 vs 97). Con magnitudes mucho más bajas, el grupo de ivermectina informó 3,5 veces más pacientes-días de síntomas gastrointestinales (21 frente a 6) y 5 veces menos dificultad para respirar (3 vs 15) (**Fig. S3**). Ningún paciente de ninguno de los grupos progresó a una enfermedad grave.

3.6. Serología

Todos los pacientes de ambos grupos tuvieron seroconversión el día 21 después del tratamiento. Los pacientes del grupo de ivermectina tenían una mediana más baja de títulos de IgG (índice 4.7, rango intercuartílico [3.5- 8.9]) que los del grupo placebo (Índice 7.5, rango intercuartílico [4.2- 9.3]) ($p = 0.24$ por Prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Fig.4**).

3.7. Seguridad

Todos los pacientes completaron el período de seguimiento de 28 días. Hubo 15 eventos adversos (7 en el grupo ivermectina y 8 en el grupo placebo), experimentados por 10 pacientes (5 en la ivermectina y 5 en el grupo placebo). No hubo eventos adversos graves.

El diario online de síntomas incluía preguntas sobre los eventos adversos específicos de la ivermectina. No hubo diferencias en el informe días-paciente entre el grupo de ivermectina y el grupo de placebo por confusión (1 versus 0), somnolencia (0 versus 0) o prurito (0 versus 3). Los pacientes en el grupo de ivermectina informaron más pacientes-días de mareos (7 versus 1) y visión borrosa (24 versus 1), con este último valor impulsado por un solo paciente en el grupo de ivermectina que informó visión borrosa en los días 2—28, una evaluación adicional sugirió presbicia no diagnosticada previamente (**Figura S4**).

No hubo grandes diferencias en la evolución de los signos vitales (**Tabla S3**), marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, procalcitonina, ferritina e IL-6) y resto de parámetros de laboratorio de los pacientes en cada grupo (**Tabla S4**).

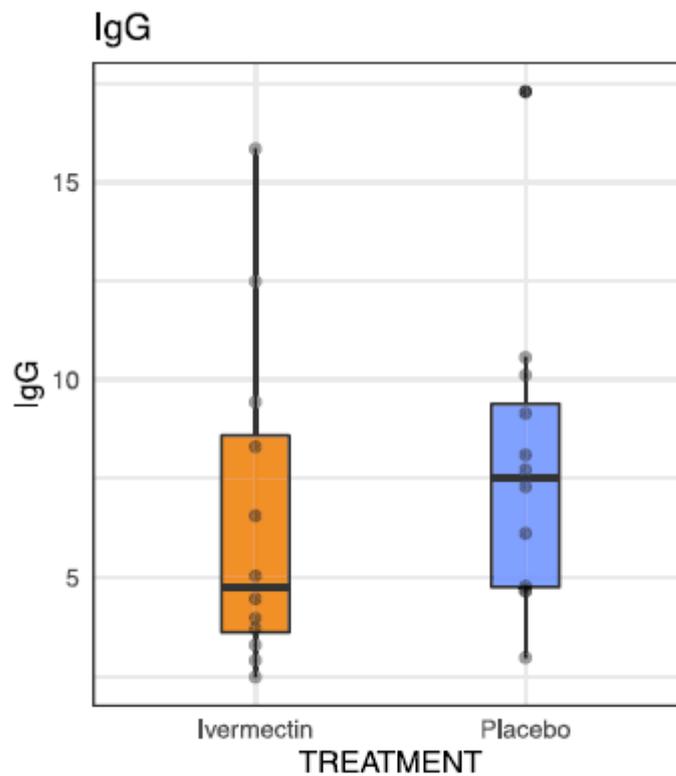


Fig. 4. IgG titers by study arm. The boxes show the interquartile range. Dots represent each individual value ($p = 0.24$, Wilcoxon rank-sum test).

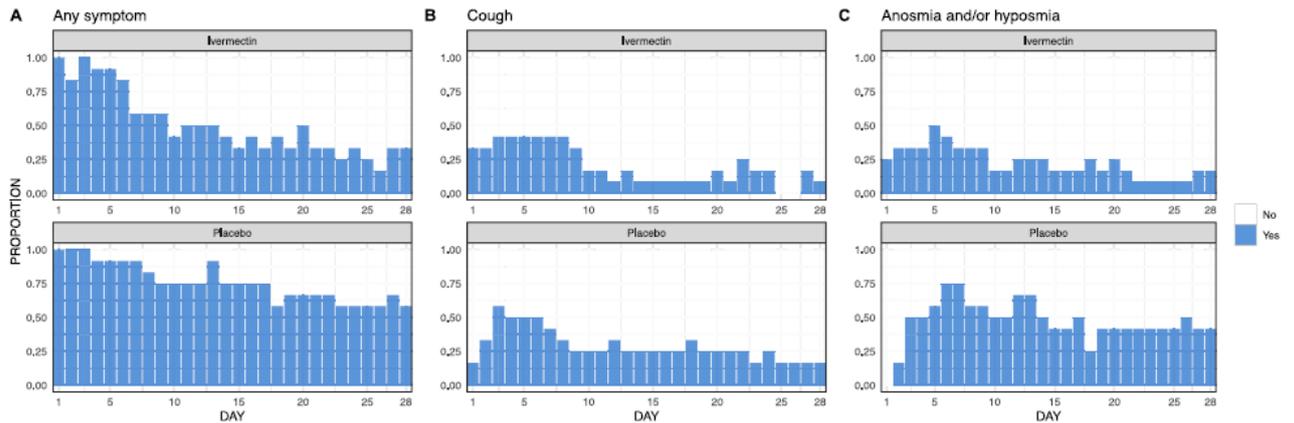


Fig. 3. Daily proportion of any self-reported symptoms, self-reported cough and self-reported anosmia/hyposmia by study arm. Each graph represents the daily proportion of individuals (n/N) who suffered from each symptom in the corresponding study arm for a 28 day follow up. Missing answers were replaced by the value in the immediately preceding day.

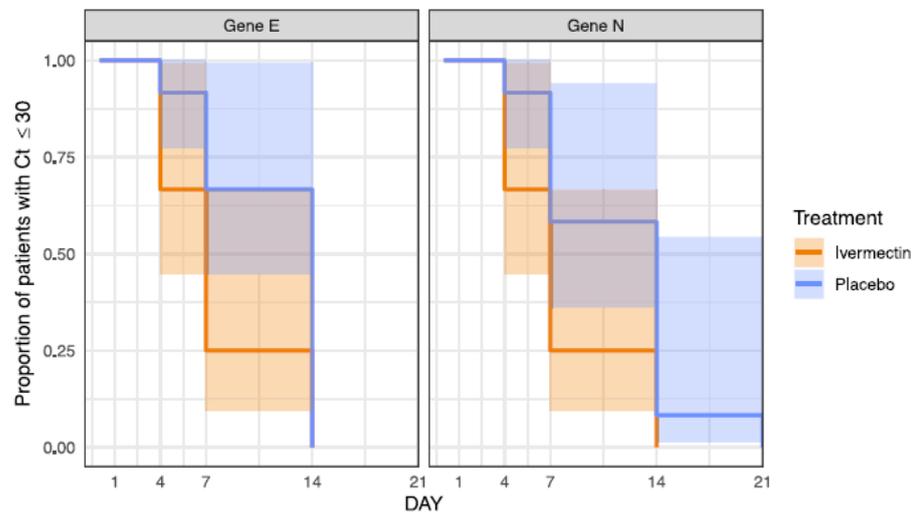


Fig. 5. Kaplan-Meier curves for viral load. A survival threshold of $Ct \geq 30$ was used. Log-Rank test yielded significance for the difference in gene E ($p = 0.0358$) and borderline significance for the difference in gene N ($p = 0.0550$).

3.8. Análisis post hoc

Dado que el objetivo principal del ensayo era explorar una reducción en la transmisión del virus y que los cultivos virales de las muestras del día 7 mostraron virus replicativo solo en muestras con valores de Ct por debajo de 30, se dibujaron curvas de Kaplan-Meier y se realizaron análisis de supervivencia con una prueba de rango logarítmico utilizando un umbral de supervivencia de Ct mayor o igual a 30. Este análisis muestra una diferencia estadísticamente significativa para el gen E ($p = 0.035$, prueba de rango logarítmico) y significancia límite para el gen N ($p = 0.055$, prueba de rango logarítmico). Las curvas se presentan en la **Fig.5**.

En el modelo de regresión logística, una menor probabilidad de presentar cualquier síntoma se observó en el brazo de la ivermectina (OR: 0.04 [IC 95%: 0.00, 0.75] $p = 0.032$). En ambos brazos, presencia de cualquier síntoma tendió a disminuir con el tiempo (OR (IC del 95%): 0.80 (0.74, 0.86) y 0.81 (0.77, 0.85), para placebo e ivermectina respectivamente). Esta tendencia hacia abajo fue similar en ambos grupos de estudio ($p = 0.687$). Con respecto a la presencia de tos, no encontramos diferencias entre los grupos de estudio ($p = 0.575$), ni una tendencia a

disminuir en el tiempo ($p = 0.373$). Sin embargo, se observaron diferencias para la presencia de anosmia/ hiposmia: para los pacientes del grupo placebo, no hubo tendencia en el tiempo en presencia de anosmia (OR (IC del 95%): 0.99 (0.95, 1.02) $p = 0.459$). Por el contrario, los pacientes en el grupo de ivermectina mostraron una disminución significativa (OR (IC del 95%): 0.90 (0.85, 0.94) $p < 0.001$) (**Fig. S5**).

El efecto global de la ivermectina sobre la anosmia / hiposmia fue principalmente impulsado por los pacientes varones (20 frente a 76 días-paciente de anosmia / hiposmia en los grupos de ivermectina y placebo respectivamente) en marcado contraste con las pacientes mujeres (56 frente a 81 pacientes-días de anosmia / hiposmia en los grupos de ivermectina y placebo respectivamente) (**Fig. S6**). Se realizó un análisis de sensibilidad para evaluar si el sexo tuvo algún impacto en el modelo de regresión logística. El agregar esta variable a los modelos no cambió los coeficientes presentados anteriormente.

Los participantes tenían un peso adiposo que oscilaba entre el 14% y el 39% de su peso corporal. Esto resultó en dosis de ivermectina por kilo de tejido adiposo que van desde 1028 mcg / kg de grasa hasta 2963 mcg / kg de grasa, incluso si las dosis reales por peso corporal total se lograron en un rango relativamente estrecho de 399-427 mcg / kg (**Tabla 2**). Las dosis de ivermectina por kg de tejido adiposo se representaron frente a la duración de la anosmia / hiposmia y el último día de anosmia / hiposmia informada sin patrón evidente; no se intentó una regresión dada la escasez de datos (**Fig. S7**).

Table 2
Body composition and dose of ivermectin-treated participants.

Participant ID	Age years	Sex M/F	Weight kg	Height m	BMI kg/m ²	Adipose weigh %	Adipose weight* kg	3-mg tablets received tablets	Total dose mg	Dose/kg mcg/kg	Dose adipose/kg mcg/kg
SAINT-5	24	Male	65.1	1.77	20.8	0.14	9.11	9	27	415	2963
SAINT-17	22	Male	72.7	1.79	22.7	0.17	12.43	10	30	413	2413
SAINT-18	18	Female	57.0	1.75	18.6	0.21	11.97	8	24	421	2005
SAINT-19	18	Female	45.1	1.55	18.8	0.21	9.61	6	18	399	1874
SAINT-3	33	Male	71.0	1.70	24.6	0.21	15.48	10	30	423	1938
SAINT-21	18	Female	50.1	1.60	19.6	0.22	11.47	7	21	419	1830
SAINT-16	20	Female	49.2	1.59	19.5	0.23	11.37	7	21	427	1848
SAINT-9	28	Male	89.9	1.79	28.1	0.26	23.82	12	36	400	1511
SAINT-11	47	Male	85.8	1.77	27.4	0.27	23.77	12	36	420	1515
SAINT-20	29	Male	92.2	1.79	28.8	0.27	25.54	13	39	423	1527
SAINT-8	39	Male	93.6	1.77	29.9	0.30	28.27	13	39	417	1380
SAINT-13	57	Female	66.0	1.57	26.6	0.39	26.27	9	27	409	1028

4. Discusión

A pesar de sus propiedades antivirales parciales, el tratamiento con ivermectina recibió una limitada atención tempranamente en Europa o en los Estados Unidos, como una posible droga a ser reutilizada contra COVID-19. Esto se basó en gran medida en un modelo de farmacocinética que destaca la incapacidad de las dosis vía oral aprobadas actualmente para alcanzar los niveles en tejido pulmonar a las concentraciones antivirales descritas por Caly y colegas, [21] incluso si otros modelos, revisados por pares, predicen una acumulación de hasta 10 veces de la ivermectina en el tejido diana [22].

Hay razones adicionales para evitar inferencias directas de los resultados de experimentos in vitro o modelos farmacocinéticos, estos incluyen el papel potencial de los metabolitos de la ivermectina, el potencial papel inmunomodulador del fármaco y preguntas sobre el virus / proporciones celulares y la idoneidad de las líneas celulares Vero utilizadas en los cultivos [23].

Este estudio piloto fue diseñado para evaluar la pregunta de si se justificaría realizar más inversiones en la posible reutilización de la ivermectina. Como tal, nuestro objetivo era generar evidencia sobre la cinética viral, respuesta de anticuerpos y eficacia clínica en una cohorte de pacientes en bajo riesgo de enfermedad grave. Sin un mecanismo de acción claro, una única señal en cualquiera de dichos parámetros no sería suficiente para justificar más esfuerzos. Este piloto muestra una tendencia a reducir la carga viral en el grupo de la ivermectina, una tendencia a reducir los títulos de IgG que puede reflejar enfermedad más leve y beneficio clínico en los síntomas cardinales de COVID-19 asociado con daño tisular: anosmia / hiposmia y tos. Estos resultados están en consonancia con la evidencia emergente de los ensayos en Bangladesh [10,11] y Argentina [12] mostrando un aclaramiento viral en participantes tratados, así como con datos recientes de un modelo de hámster SARS-CoV-2 del Instituto Pasteur que también mostró una marcada dicotomía sexual en el efecto de la ivermectina sobre anosmia / hiposmia [24].

A la espera de la confirmación de estos resultados, este piloto arroja algo de luz sobre el posible mecanismo de acción de la ivermectina contra COVID-19. Tenga en cuenta que la prueba no fue diseñada para detectar diferencias modestas en carga viral, aunque se sugiere un pequeño efecto cuando se determinó la carga viral directamente por PCR e indirectamente usando títulos de IgG como marcadores de gravedad de la enfermedad [25, 26]. Además, en este piloto, la ivermectina redujo la duración de los síntomas asociados con la inflamación sistémica como fiebre o malestar, ni ha tenido un impacto medible en los marcadores inflamatorios sistémicos.

Dados estos hallazgos, se podrían considerar mecanismos de acción distintos a un efecto antiviral directo. Una explicación alternativa podría ser una modulación alostérica positiva del receptor nicotínico de acetilcolina causado por la ivermectina, y a una regulación a la baja del receptor ACE-2 y la entrada viral en las células del epitelio respiratorio y bulbo olfatorio [27].

Otro mecanismo a través del cual la ivermectina podría influir en la reversión de la anosmia es mediante la inhibición de la activación de vías proinflamatorias en el epitelio olfatorio. Se cree que la inflamación de la mucosa olfativa juega un papel clave en el desarrollo de la anosmia en la infección por SARS-CoV-2 [28].

Se sabe que la ivermectina regula a la baja la expresión de varios genes proinflamatorios, incluidos los de IL-8, TNF- α y catelicidina LL-37 [29]. Se cree que este efecto explica parcialmente la eficacia de la ivermectina en el tratamiento de la rosácea [29,30]. El efecto en LL-37 puede ser particularmente importante, ya que esta molécula influye directamente en varias vías pro y antiinflamatorias, incluida la estimulación de la producción de IL-18 e IL-1 β , y tiene un efecto quimiotáctico para los neutrófilos y eosinófilos [31]. Este efecto puede estar mediado por la inhibición la entrada del receptor de vitamina D (VDR) en el núcleo [32]. La ivermectina inhibe las importinas de la familia α/ β , que desempeñan un papel clave en el transporte independiente del ligando del VDR, un paso crucial en la expresión mediada por vitamina D del gen hCAMP18, que codifica el precursor LL-37 [33-35]. Es posible que la inhibición de las importinas puede contribuir así al efecto de la ivermectina en la regulación de sistema inmune, y su influencia sobre otras vitaminas mediadas por la vía de la vitamina D, apoyando nuevos estudios en esta área.

Aunque requieren confirmación, estos resultados plantean varias preguntas. Si el mecanismo de acción de la ivermectina contra COVID-19 está relacionado con un efecto nicotínico, ya que concentraciones inhibitorias para este receptor (que están en el rango nanomolar) podría ser

alcanzables en el tejido pulmonar durante un corto período de tiempo con la dosificación oral y durante períodos considerablemente más largos con la terapia nebulizada [36].

Si el mecanismo es inmunomodulador, entonces la dosis adecuada y el régimen debe adaptarse en consecuencia. Antes de considerar esquemas de dosis más altas o múltiples, también es necesario comprender mejor el papel potencial de los metabolitos de la ivermectina en cualquier efecto. Finalmente, dada la tendencia a disminuir los títulos de IgG en el grupo de la ivermectina, es necesario evaluar la posible relación entre tratamiento con ivermectina, la gravedad de la enfermedad, la inflamación, la dinámica viral y los títulos de anticuerpos; [37,38] debe prestarse especial atención a la respuestas inmunes humorales y celulares a largo plazo contra el SARS-CoV-2 en los pacientes tratados con ivermectina.

Este piloto apunta hacia un uso potencial de ivermectina en COVID-19 que justifique una mayor exploración en ensayos más amplios, con resultados en pacientes con factores de riesgo o enfermedad más grave. Esto es de particular importancia para entornos con recursos limitados dado el bajo precio de la ivermectina, la amplia disponibilidad y la escalabilidad de los procesos de manufactura.

Este piloto tiene varias limitaciones clave que justifican una interpretación cuidadosa de los resultados. En primer lugar, fue diseñado para explorar una potencial señal para el uso de ivermectina en COVID-19, no para proporcionar evidencia definitiva sobre el tema, de ahí su pequeño tamaño de muestra. Segundo, este piloto se restringió a sujetos con enfermedad no grave y sin factores de riesgo, en quienes se administró el tratamiento en las primeras 48 horas de fiebre o tos, esto debe tenerse en cuenta para el diseño de cualquier estudio confirmatorio. Además, la cuantificación de la carga viral presentada está intrínsecamente limitada por la heterogeneidad en las muestras, incluso si todas fueran obtenidas por los mismos médicos, la estandarización contra un gen de la célula epitelial humana sería necesario para asegurarse de que las cargas virales sean realmente comparables [39].

La señal positiva encontrada en este piloto garantiza la conducción de ensayos más grandes que utilicen la ivermectina para el tratamiento temprano de COVID-19. Dichos ensayos deben incluir pacientes con factores de riesgo de enfermedad grave, así como pacientes con neumonía. El potencial de un mecanismo de acción diferente al de efecto antiviral directo, también abre la puerta a la profilaxis preexposición en grupos de alto riesgo.

Referencias

[1] WHO. COVID-19 Weekly epidemiological update - 15 December 2020. Available at <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-15-december-2020> (Accessed December 21, 2020).

[2] Rubin R. Difficult to determine herd immunity threshold for COVID-19. *JAMA* 2020;324(8):732.

[3] Fontanet A, Cauchemez S. COVID-19 herd immunity: where are we? *Nat Rev Immunol* 2020;20(10):583–4.

[4] WHO. Newsroom - coronavirus disease (COVID-19): vaccines. Available at [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)

(accessed December 21, 2020).

[5] Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin alpha/beta-mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J* 2012;443(3):851–6.

[6] Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, et al. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe* 2016;20(2):259–70.

[7] Mastrangelo E, Pezzullo M, De Burghgraeve T, et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(8):1884–94.

[8] Caly L, Druce J, Catton M, Jans D, KM W. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* 2020;178:104787.

[9] Chaccour C, Brew J, Garcia-Basteiro A. Ivermectin and COVID-19: how a flawed database shaped the pandemic response of several Latin-American countries. Available at: <https://www.isglobal.org/en/healthisglobal/-/custom-blog-portlet/ivermectin-and-covid-19-how-a-flawed-database-shaped-the-covid-19-response-of-several-latin-american-countries/2877257/0> (Accessed Nov 2020).

[10] Clinical trial of ivermectin plus doxycycline for the treatment of confirmed COVID-19 infection. NCT04523831. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04523831> (accessed Nov 2020).

[11] Ahmed S, Karim MM, Ross AG, et al. A five day course of ivermectin for the treatment of COVID-19 may reduce the duration of illness. *Int J Infect Dis* 2020.

[12] Krolewiecki A, Lifschitz A, Moragas M, et al. Antiviral effect of high-dose ivermectin in adults with COVID-19: a pilot randomised, controlled, open label, multicentre trial. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3714649> (accessed Nov 2020).

[13] Rajter JC, Sherman MS, Fatteh N, Vogel F, Sacks J, Rajter JJ. Use of ivermectin is associated with lower mortality in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: the ICON study. *Chest* 2020.

[14] Chaccour C, Ruiz-Castillo P, Richardson MA, et al. The SARS-CoV-2 Ivermectin Navarra-ISGlobal Trial (SAINT) to evaluate the potential of ivermectin to reduce COVID-19 transmission in low risk, non-severe COVID-19 patients in the first 48 h after symptoms onset: a structured summary of a study protocol for a randomized control pilot trial. *Trials* 2020;21(1):498.

[15] European_Medicines_Agency. EMA decision of 18 December 2012 on the granting of a product-specific waiver for ivermectin. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/PIP_decision/WC500138600.pdf (accessed July 2015).

[16] Rhee C, Kanjilal S, Baker M, Klompas M. Duration of SARS-CoV-2 infectivity: when is it safe to discontinue isolation? *Clin Infect Dis* 2020 <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1249/5896916>.

- [17] Benefield AE, Skrip LA, Clement A, Althouse RA, Chang S, Althouse BM. SARS-CoV-2 viral load peaks prior to symptom onset: a systematic review and individual pooled analysis of coronavirus viral load from 66 studies. medRxiv 2020 2020.09.28.20202028.
- [18] He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nat Med 2020.
- [19] Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. Ann Intern Med 2020;172(9):577–82.
- [20] Gomez-Ambrosi J, Silva C, Galofre JC, et al. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. Int J Obes (Lond) 2012;36(2):286–94.
- [21] Bray M, Rayner C, Noel F, Jans D, Wagstaff K. Ivermectin and COVID-19: a report in antiviral research, widespread interest, an FDA warning, two letters to the editor and the authors' responses. Antiviral Res 2020:104805.
- [22] Arshad U, Pertinez H, Box H, et al. Prioritization of anti-SARS-Cov-2 drug repurposing opportunities based on plasma and target site concentrations derived from their established human pharmacokinetics. Clin Pharmacol Ther 2020;108(4):775–90.
- [23] Hoffmann M, Mosbauer K, Hofmann-Winkler H, et al. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2. Nature 2020;585(7826):588–90.
- [24] de Melo GD, Lazarini F, Larrous F, et al. Anti-COVID-19 efficacy of ivermectin in the golden hamster. bioRxiv 2020 2020.11.21.392639.
- [25] Marklund E, Leach S, Axelsson H, et al. Serum-IgG responses to SARS-CoV-2 after mild and severe COVID-19 infection and analysis of IgG non-responders. PLoS One 2020;15(10):e0241104.
- [26] R€oltgen K, Powell AE, Wirz OF, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. Sci Immunol 2020;5(54):eabe0240.
- [27] Changeux j-p, Amoura Z, Rey F, Miyara M. A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic implications. C R Biol 2020;343(1):33–9.
- [28] Torabi A, Mohammadbagheri E, Akbari Dilmaghani N, et al. Proinflammatory cytokines in the olfactory mucosa result in COVID-19 induced anosmia. ACS Chem Neurosci 2020;11(13):1909–13.
- [29] Schaller M, Gonser L, Belge K, et al. Dual anti-inflammatory and anti-parasitic action of topical ivermectin 1% in papulopustular rosacea. J Eur Acad Dermatol Venereol 2017;31(11):1907–11.
- [30] Thibaut de M_enonville S, Rosignoli C, Soares E, et al. Topical treatment of rosacea

with ivermectin inhibits gene expression of cathelicidin innate immune mediators, LL-37 and KLK5, in reconstructed and ex vivo skin models. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2017;7(2):213–25.

[31] Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J Immunol* 2013;191(10):4895–901.

[32] Han A, Singh R, Robinson-Bostom L, Vezeridis M, Weinstock M, Moore R. MeTC7, a novel vitamin D receptor (VDR) antagonist, induces cytotoxicity in metastatic melanoma cell lines and inhibits importin-mediated VDR nuclear transport and signaling. *J Am Acad Dermatol* 2015;72(5):AB172.

[33] 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. *Biochem J* 2012;443(3):851–6.

[34] Miyauchi Y, Michigami T, Sakaguchi N, et al. Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. *J Biol Chem* 2005;280(49):40901–8.

[35] Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Fut Microbiol* 2009;4(9):1151–65.

[36] Chaccour C, Abizanda G, Irigoyen-Barrio A, et al. Nebulized ivermectin for COVID-19 and other respiratory diseases, a proof of concept, dose-ranging study in rats. *Sci Rep* 2020;10(1):17073.

[37] Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020;20(6):656–7.

[38] Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo A, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* 2020 [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5).

[39] Dahdouh E, Lazaro-Perona F, Romero-Gomez MP, Mingorance J, Garcia-Rodriguez J. Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load. *J Infect* 2020.