
BLANCOS CELULARES COMO MECANISMO ALTERNATIVO EN LA TERAPIA ANTIVIRAL

JOSEPH T. ORTEGA,
HÉCTOR R. RANGEL
y FLOR H. PUJOL

RESUMEN

Las complicaciones que derivan de las infecciones causadas por patógenos virales y el desarrollo de resistencia por parte de estos últimos han llevado a la búsqueda incesante de nuevas estrategias y nuevos compuestos que puedan ser utilizados en la terapia antiviral. Una de estas estrategias es la terapia antiviral dirigida a blancos celulares (TA BC), la cual está basada en la condición parasitaria del virus con su hospedero. El bloqueo temporal de procesos celulares asociados al ciclo de replicación viral puede conllevar a un colapso en éste. En esta revisión se enmarca dicha visión alternativa de la terapia antiviral, demostrando con ejemplos

los posibles blancos celulares y sus respectivos compuestos y mecanismos reguladores, los cuales han sido evaluados en modelos virales. La TEBC probablemente estará, en un futuro, en los esquemas terapéuticos contra diversas afecciones virales, fundamentados en el posible efecto sinérgico que se obtendría al combinarla con la terapia antiviral tradicional, además de la ventaja teórica de obtener un efecto pan-antiviral y una prácticamente nula tasa de mutación en el blanco. Sin embargo, es necesario desarrollar y aplicar modelos teóricos-prácticos, que permitan evaluar su eficacia y sus posibles efectos tóxicos para el hospedero.

El desarrollo de la virología ha permitido comprender la relación que existe entre los virus y diversas patologías humanas, las cuales están relacionadas con una disminución en la calidad de vida de los pacientes y generan pérdidas económicas importantes, reflejadas como días no laborados y asociadas al costo de los medicamentos (Morris *et al.*, 2012). Las fallas en los tratamientos antivirales actuales han motivado la búsqueda, desarrollo y evaluación de nuevos compuestos o combinaciones de los ya aprobados, para proponer esquemas terapéuticos efectivos y eficaces. Estas fallas están generalmente asociadas a la aparición de resistencia a antivirales.

En esta revisión se describe el estudio y desarrollo de nuevas estrate-

gias terapéuticas basadas en el bloqueo selectivo de funciones del huésped como mecanismo alternativo en la terapia antiviral.

Terapia Antiviral Clásica

A finales de 1970 se aprobó el uso de derivados de nucleósidos, los cuales bloquean las polimerasas virales a concentraciones que no afectan al hospedero. Desde entonces la agencia reguladora de drogas y alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration; FDA) ha aprobado aproximadamente 50 compuestos y sus combinaciones para su uso en la terapia antiviral. Sin embargo, en años recientes la demanda por nuevas estrategias antivirales ha aumentado debido al incremento en la prevalencia de enfer-

medades crónicas y a la aparición de nuevas patologías asociadas a agentes virales, en especial el VIH (Antonelli *et al.*, 2012).

Hasta la fecha podemos clasificar los compuestos utilizados en la terapia antiviral de la siguiente manera: 1) inhibidores de la adsorción o la entrada viral; 2) inhibidores de la decapsidación; 3) inhibidores de la síntesis viral de ácidos nucleicos, incluyendo la integración; 4) inhibidores de proteasas; y 5) inhibidores de la liberación, incluyendo los inhibidores de neuraminidasa. (De Clercq, 2013)

Terapia Antiviral Enfocada a Blancos Celulares

Los virus dependen de la célula huésped para replicarse de ma-

PALABRAS CLAVE / Antivirales / Blancos Celulares / Terapia /

Recibido: 10/04/2013. Modificado: 21/12/2013. Aceptado: 21/12/2013.

Joseph T. Ortega C. Farmacéutico con mención en Microbiología, Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela. Doctorante en Microbiología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela. Dirección: Laboratorio de Virología Molecular, CMBC, IVIC, Apdo. 20632, Caracas 1020-A, Venezuela. e-mail: jotoc_ortega@hotmail.com

Héctor R. Rangel. Licenciado en Biología y Doctor en Biología Celular, UCV, Venezuela. Investigador, IVIC, Venezuela.

Flor H. Pujol. Licenciada en Biología, Universidad Simón Bolívar, Venezuela. M.Sc. y Ph.Sc. en Biología, IVIC, Venezuela. Investigador, IVIC, Venezuela.

nera efectiva. Además comparten diversas vías metabólicas con su hospedero y para ciertas funciones codifican proteínas estrechamente relacionadas con funciones celulares que a través de la evolución se han adaptado para funcionar conjuntamente con los procesos celulares. Por esta razón, se ha pensado en interrumpir la replicación viral con fármacos que tengan como blanco la contraparte celular.

Como fue expuesto anteriormente, la principal falla de la terapia antiviral es la aparición de resistencia a los fármacos. Enfocar como blanco del fármaco un factor celular requerido para la replicación viral limitaría, en teoría, el desarrollo de variantes virales resistentes. Adicionalmente se podría observar un efecto pan-antiviral e inhibir todos los virus que sean dependientes del mismo factor. La limitación de esta estrategia es que esta inhibición potencialmente tendría una desventaja asociada a una mayor toxicidad para el hospedero. Por otra parte, el desarrollo de compuestos dirigidos a inhibir procesos celulares asociados con el ciclo de replicación viral, permite a su vez el entendimiento de la relación existente entre el virus y los procesos que se desarrollan en conjunto con su célula hospedera.

Plantear la inhibición de blancos celulares cuestiona el paradigma tradicional de la terapia antiviral, la cual se ha enfocado en que dicha terapia 'debe estar dirigida sólo al blanco viral'. Sin embargo, aunque este enfoque puede representar un avance de interés útil para las infecciones virales, fármacos dirigidos a blancos celulares tendrían que ser sujetos a una farmacovigilancia exhaustiva para evitar interferir con funciones vitales y evitar que ocurran efectos tóxicos para el hospedero.

A continuación se describen los blancos celulares que han sido evaluados como posibles alternativas en la terapia antiviral, agrupándolos, según el proceso celular inhibido, en tres grandes grupos: inhibidores de la entrada y transporte intracelular, inhibidores de la replicación e inhibidores de la síntesis y modificaciones post-transduccionales de proteínas.

Inhibidores de la Entrada y Transporte Intracelular

Receptores celulares

En el proceso de infección a la célula huésped, el virus primero debe adherirse a la superficie celular, lo que realiza a través de la interacción de las proteínas virales externas con receptores o estructuras de la membrana celular. Hasta la fecha, se ha logrado dilucidar algunos de los receptores celulares asocia-

dos a la entrada de diferentes virus. Entre ellos tenemos el virus de herpes simples (VHS), donde se ha demostrado la unión del virión a los glicosaminoglicanos (GAG) de la superficie celular. En base a esto, se ha evaluado el efecto inhibitorio de diversos compuestos en la entrada del VHS; uno de ellos es la lactoferrina, que demostró ejercer actividad antiviral contra VHS-1 y VHS-2 en modelos *in vitro*. Probablemente el mecanismo de acción de esta droga esté asociado con la neutralización de las cargas negativas presentes en los glicosaminoglicanos de la superficie celular (Jenssen *et al.*, 2004).

Otro modelo viral en el que se ha estudiado ampliamente la interacción del virus con la célula hospedera, es el VIH, donde se ha dilucidado que la entrada está mediada por las glicoproteínas de la envoltura viral (gp120 y gp41) y los receptores celulares CD4, CCR5 y/o CXCR4. Se han descrito diversos compuestos que pueden inhibir la entrada de VIH, entre los que podemos mencionar las defensinas, compuestos derivados de plantas y fármacos sintéticos (Chukwuka *et al.*, 2012). Actualmente en la terapéutica contra el VIH se cuenta con fármacos que bloquean las interacciones del virus con su célula blanco, pudiéndose citar el maraviroc, un antagonista del receptor CCR5, aprobado por la FDA. Adicionalmente, compuestos como el vicriviroc se encuentran en fase de estudios clínicos, como posibles inhibidores de la entrada del VIH (Caseiro *et al.*, 2012).

Endosomas

Luego de la interacción del virus con la membrana celular, ocurren diversos procesos que le permiten migrar a los distintos compartimientos celulares. Uno de ellos es la endocitosis, la cual favorece ciertos cambios en la estructura viral, además de la activación de diversas enzimas. La endocitosis está mediada por la variación de pH del endosoma y por enzimas endosomales, siendo la familia de las catepsinas una de las más importantes (Chandran *et al.*, 2005).

Diversos virus utilizan este mecanismo, por lo que su inhibición se ha evaluado como blanco terapéutico en diversos modelos virales, entre ellos se encuentra el virus Ébola, donde se ha evidenciado que las catepsinas L/B escinden los precursores de la glicoproteína de la envoltura, generando así una proteína funcional. Este proceso es bloqueado en modelos *in vitro* por inhibidores específicos de la catepsina L/B (Gnirss *et al.*, 2012). Otro compuesto ensayado como antiviral con actividad en los endosomas es la amiodarona, la cual se ha evaluado

en modelos *in vitro* de SARS-Coronavirus, en los que se observó que es capaz de interferir con la vía endocítica tardía, necesaria para la liberación del genoma viral al citoplasma (Konrad *et al.*, 2008). En estos modelos virales de Ébola y SARS, también han sido evaluados compuestos derivados de oxocarbazato, los cuales actúan a nivel endosomal, demostrándose que poseen actividad antiviral *in vitro* (Shah *et al.*, 2010). Barquero *et al.* (2004) demostraron que el cinamoil-3,11-dihidroximeliocarpina, un tetranoiterpenoide de origen natural, posee actividad antiviral *in vitro*, siendo capaz de bloquear la vía endocítica del virus de la estomatitis vesicular (VSV) mediante la alcalinización del pH del endosoma.

Los cuerpos lisosomales son formados luego que la vesícula endocítica se fusiona con un lisosoma. Existen compuestos que interactúan selectivamente con los lisosomas. Estos agentes lisosomotrópicos generan un aumento del flujo de protones y por ende el aumento de pH del lisosoma. Agentes como la cloroquina y el cloruro de amonio han sido evaluados en modelos *in vitro* de hepatitis C (Ashfaq *et al.*, 2011), observándose que tienen un efecto antiviral dosis dependiente, y que generan una inhibición en el cambio conformacional y procesamiento enzimático de las proteínas virales dentro de los lisosomas. Estos compuestos también están siendo evaluados en modelos de Coronavirus, Flavivirus y VIH (Savarino *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2005).

Microtúbulos y microfilamentos

El citoesqueleto celular proporciona la base para la migración intracelular del virus, desde la superficie de la célula a su interior y/o a los distintos compartimientos celulares, entre ellos el núcleo. Este tráfico depende de la interacción viral con la combinación de filamentos de actina y microtúbulos (Bearer *et al.*, 2002). Fármacos derivados de alquenildiarilmetano bloquean el movimiento de virus asociados a los microtúbulos y han sido evaluados como terapia antiviral en modelos *in vitro* de VIH (Cullen *et al.*, 2008). Raghu *et al.* (2009) evaluaron la inhibición de la polimerización de la actina y su efecto inhibitorio en el Sarcoma de Kaposi asociado a herpes virus.

Sin embargo, dada la importancia que juegan los microtúbulos en la homeostasis celular, su bloqueo puede generar efectos tóxicos significativos, incluyendo la muerte celular mediada por apoptosis, razón por la que las investigaciones para el desarrollo de fármacos antivirales con este mecanismo de acción han sido limitadas.

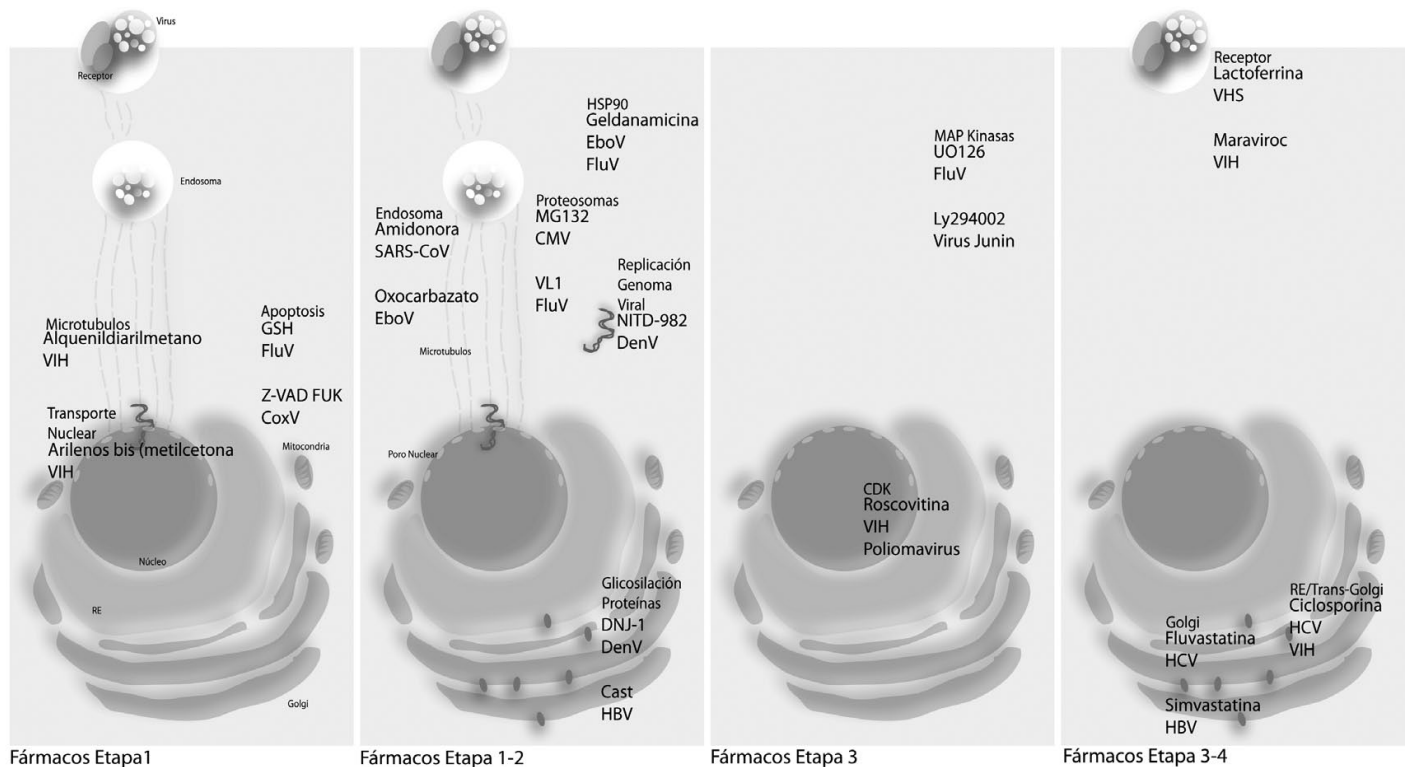


Figura 1. Representación gráfica de los blancos celulares y sus inhibidores. La figura describe un ciclo hipotético de replicación viral en una célula permisiva. Se clasifican los fármacos en cuatro grupos denominadas etapas, numeradas de 1 a 4, realizando una analogía con los estudio de fase clínica en la aprobación de los fármacos. Estos fármacos no han sido diseñados para el tratamiento de las afecciones virales; sin embargo, por su actividad inhibitoria han sido evaluados en modelos antivirales. Los fármacos en la etapa 1 han sido estudiados principalmente *in Vitro* y su uso en la terapéutica posiblemente este asociado a una alta toxicidad *in vivo*. En la etapa 1-2 se encuentran los fármacos para los que hacen falta estudios de corroboración de efectos tóxicos en modelos crónicos *in vivo*. En la etapa 3 se encuentran los fármacos que están siendo evaluados en cuanto a sus efectos crónicos y efectos adversos *in vivo*. Por último, en la etapa 3-4 se encuentran los fármacos que han sido sujetos a estudios crónicos *in vivo*. FluV: virus influenza, CoxV: coxsackie virus, GSH: glutatión, EboV: virus ébola, CMV: citomegalovirus, DenV: virus dengue, HBV: virus de la hepatitis B, Cast: castanospermina, DNJ-1: 1-deoxinojirimicina.

Poros nucleares

La mayoría de los virus de genoma constituido por ADN o en los que el ADN es un intermediario en la replicación viral, requieren de la maquinaria nuclear del hospedero para su replicación. Para ello deben ingresar al núcleo, pasando a través de la membrana nuclear, y una de las vías utilizada son los poros nucleares. El bloqueo de poros nucleares como blanco terapéutico ha sido evaluado en modelos *in vitro* de VIH, específicamente compuestos derivados de arilenos bis (metilcetona) que fueron capaz de inhibir el complejo de transporte nuclear a este nivel y por ende generan una supresión de la replicación viral en este modelo (Glushakova *et al.*, 2000).

Inhibidores de la Replicación

Vía de señalización de las kinasas (MAPK)

La cascada de señalización RAF / MEK / ERK, pertenece a la cascada de proteína-kinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en in-

glés). Dicha señalización conduce a determinados estímulos que controlan la diferenciación y proliferación celular incluyendo cambios en la expresión genética, alteraciones en el metabolismo celular o la inducción de muerte celular programada (apoptosis). Esta vía es activada por agentes extracelulares, incluyendo patógenos tales como virus de ARN y ADN que promueven el estadio de proliferación celular, para utilizar a su favor la maquinaria de replicación celular y los procesos asociados (Pleschka *et al.*, 2008). Se han desarrollado investigaciones basadas en la posible actividad antiviral de compuestos con efectos inhibitorios sobre estas vías de señalización. Uno de ellos es el U0126, un inhibidor selectivo de MEK, el cual en modelos *in vitro* de influenza genera una disminución en la replicación viral, asociada a un bloqueo en la exportación nuclear del virus (Droebner *et al.*, 2011). Además, se ha determinado en estos modelos que bajo el esquema utilizado no se producen variantes virales resistentes al U0126 (Ludwig *et al.*, 2004).

El compuesto UO126 combinado con inhibidores de la activación del factor nuclear potenciador de las

cadena ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB), han sido evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo* de influenza, observándose que no solo genera un efecto negativo sobre la replicación viral, sino que logra una disminución en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias asociadas con la patogénesis de este virus (Pinto *et al.*, 2011).

El bloqueo farmacológico selectivo de kinasas celulares está siendo evaluado por distintos grupos de investigadores, enfocados en desarrollar un tratamiento antiviral para la influenza y otros virus, entre los que podemos destacar: virus Herpes, virus Junin, Coronavirus y Enterovirus 71 (Cai *et al.*, 2007; Linero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010).

Inhibición de la síntesis de ADN/ARN

Las enzimas implicadas en la biosíntesis de nucleósidos son blancos potenciales para el desarrollo de antivirales. Entre ellas está la ribavirina, capaz de suprimir la síntesis de guanina generando una depleción intracelular de GTP (Ölschläger *et al.*, 2011). Los inhibidores

de la ruta de biosíntesis de pirimidinas han demostrado también actividad antiviral *in vitro*. El compuesto NITD-982 inhibe la deshidrogenasa dihidroorotato (DHODH), una enzima celular requerida para la biosíntesis de pirimidina y genera un bloqueo en la replicación del virus dengue (Wang *et al.*, 2011). El compuesto denominado A3, de bajo peso molecular, ha demostrado inhibir la DHODH, observándose un efecto pan-antiviral, ya que inhibe un amplio espectro de familias virales, por lo menos ocho, incluyendo virus de naturaleza de genoma ARN (Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Flaviviridae, Togaviridae), y ADN (Poxviridae, Adenoviridae), así como retrovirus (Retroviridae) (Hoffmann *et al.*, 2011).

Ciclinas dependientes de kinasas (CDK)

Las CDK son una familia de quinasas serina/treonina implicadas en la regulación de la división celular (cdks1, 2, 3, 4, 6 y 7), la transcripción (cdks7, 8 y 9) y el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto (cdk5). Se ha demostrado que inhibidores de CDK tienen un potente efecto antiviral *in vitro*, posiblemente asociados a la dependencia de la replicación viral en estas enzimas (Schang *et al.*, 2002). En modelos virales de infección con el virus JC, un poliomavirus causante la leucoencefalopatía multifocal progresiva, donde se utilizó un inhibidor de CDK, la roscovitina, se generó un bloqueo en la producción viral y una disminución en los efectos citopáticos asociados con el virus. De la misma manera se observó una atenuación de la transcripción de los genes virales tardíos (Orba *et al.* 2008).

Diversos autores han indicado que el complejo CDK-2/ciclina E, cuya actividad máxima es durante la fase G1 tardía del ciclo celular, es uno de los más importantes asociados a la replicación viral (Schang *et al.*, 2004). En modelos *in vitro* de VIH se ha demostrado que el mismo complejo interviene en la transcripción del gen *tat*; en este sentido Agbottah *et al.* (2005) evaluaron el bloqueo de quinasas celulares necesarias para la transcripción del VIH-1 con CYC202 (R-roscovitina), señalando también que el bloqueo del complejo CDK-2/ciclina E no genera efectos tóxicos sobre modelos *in vivo*. Además, se evaluó *in vitro* el efecto antiviral de CYC202, observándose que inhibe el VIH-1, tanto el tipo salvaje como a los mutantes resistentes a otros antivirales.

Expresión génica (ARN de interferencia y microARN)

La tecnología ARN interferencia es la más reciente de una larga

línea de estrategias basadas en la interacción de diversos compuestos con ácidos nucleicos, los que incluyen el ADN antisentido, las ribozimas y haptámeros. De forma simple podemos generalizar el mecanismo de acción de estos fármacos como el bloqueo selectivo de la expresión génica, asociado al reconocimiento específico de secuencias nucleotídicas en el material genético celular o viral. El desarrollo de estas modalidades terapéuticas ha sido seriamente obstaculizada por problemas prácticos tales como la toxicidad, la inestabilidad en el suero y el acceso a los sitios blanco (Arbuthnot *et al.*, 2011). Sólo un fármaco ha sido aprobado por la FDA para su uso terapéutico, el vitravene, que es utilizado para tratar la retinitis por citomegalovirus en pacientes positivos para VIH (Haasnoot *et al.*, 2007).

En modelos *in vitro* de virus dengue se ha evaluado el efecto de ARN de silenciamiento sobre la expresión de receptores celulares asociados a la entrada del virus, observándose un potencial efecto antiviral (Alhoot *et al.*, 2011). En otro trabajo, Martínez *et al.* (2002) suprimieron *in vitro* la expresión de los coreceptores CCR5 y CXCR4 de VIH, mediante ARN de interferencia, obteniendo un efecto negativo sobre la entrada del virus en las células y por ende un bloqueo en el ciclo de infección viral.

Recientemente se ha estudiado el bloqueo de microARN asociado a la expresión génica viral a través de oligonucleótidos, observando resultados promisorios. El miravirsen es el prototipo de fármaco dirigido contra el microARN mir122, el cual está asociado a la replicación del virus de la hepatitis C (VHC). Dicho compuesto se encuentra en fase clínica 2, para el tratamiento de la infección por VHC (Lindow *et al.*, 2012).

Proteosoma

La vía ubiquitina-proteosoma es un sistema controlado de degradación proteica, que influye en funciones tan importantes como el procesamiento de antígenos, la regulación del ciclo celular, regulación transcripcional y reparación del ADN, entre otros. Por esta razón los virus han ‘desarrollado’ mecanismos para utilizar o manipular la vía del ubiquitina-proteosoma para favorecer su ciclo viral en el hospedero (Gao *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el bloqueo del proteosoma genera un efecto antiviral en modelos *in vitro*. Por ejemplo, el compuesto MG132, un inhibidor del proteosoma, produce una inhibición de la replicación y ensamblaje del citomegalovirus (Kaspari *et al.*, 2008). Tran *et al.* (2010) demostraron que dicho bloqueo genera un efecto negativo en los

diferentes estadios de la infección, así como una disminución en la expresión génica viral. En modelos *in vitro* de paramixovirus la maduración viral ha sido bloqueada por MG132, un inhibidor del proteosoma (Watanabe *et al.*, 2005). En modelos *in vivo* de influenza el compuesto VL-01, otro inhibidor del proteosoma, genera un efecto antiviral por disminución de la activación de citoquinas asociadas con la patogénesis viral y en modelos *in vitro* genera un bloqueo en la translocación nuclear de la polimerasa viral (Haasbach *et al.*, 2011).

Apoptosis

Los virus son capaces de controlar algunos aspectos cruciales de la homeostasis de la célula huésped, con el objetivo modificar el metabolismo celular, influyendo en el ciclo celular y la regulación de la maquinaria apoptótica. Algunos virus pueden inducir la muerte celular como estrategia para escapar de la respuesta del sistema inmune del hospedero (Kountouras *et al.*, 2003). Dependiendo de la patología y del estadio en el ciclo viral, la estrategia puede ser inhibir o favorecer la apoptosis, como mecanismo antiviral. Un ejemplo de ello es el cidofovir, un nucleósido fosfonato acíclico con una actividad de amplio espectro contra los virus de ADN, incluyendo el virus del papiloma humano (VPH). En modelos *in vitro*, el tratamiento de células infectadas por VPH con cidofovir ha dado lugar a una inhibición de la proliferación celular, y se ha demostrado que esta inhibición esta asociada con la regulación de p53 y de factores inhibidores de ciclinas (Coremans *et al.*, 2009). En el caso de los Coxsackievirus, se ha reportado que existe un aumento de la apoptosis durante su infección. La inhibición de la apoptosis por Z-VAD FMK, un inhibidor no selectivo de caspasas, genera una disminución en la progenie viral (Martin *et al.*, 2007).

Inhibidores de la Síntesis, Plegamiento y Modificaciones Post-Transduccionales de Proteínas

Síntesis de proteínas

La maquinaria de síntesis proteica celular se ha evaluado como posible blanco para la inhibición viral. Torres *et al.* (2012) estudiaron el efecto antiviral de la dihidroepiandrosterona (DHEA) y sus derivados sintéticos en modelos *in vitro* de virus de herpes simple-1, mostrando un efecto inhibitorio sobre la multiplicación viral y determinando que la actividad antiviral estaba relacionada con la disminución de proteínas virales. Estos com-

puestos también han sido evaluados en modelos de virus Junin y otros Arenavirus, observándose el efecto antiviral asociado a la disminución de la síntesis de proteínas virales (Acosta *et al.*, 2008).

Plegamiento y cambio conformacional de proteínas

Proteína de choque térmico 90 (Hsp90). La proteína de choque térmico 90 (Hsp90) es una chaperona molecular que guía la disposición del plegado intracelular y proteolítico de muchos de los factores reguladores del crecimiento y de la diferenciación celular. Se ha descrito que la Hsp90 está asociada con la actividad de las polimerasas virales y el correcto plegamiento de las proteínas virales (Geller *et al.*, 2012). Inhibidores de la Hsp90 como la geldanamicina están siendo evaluados en la terapéutica del cáncer, así como su efecto antiviral, en modelos *in vitro*. Uno de estos modelos es el virus Ébola, donde se observó un potente bloqueo de la replicación viral (Smith *et al.*, 2010). La inhibición de Hsp90 bloquea la replicación del virus vaccinia, mediada por la interacción de la Hsp90 con las proteínas virales en el citoplasma (Hung *et al.*, 2002). Asimismo se ha demostrado que la Hsp90 se une a la subunidad PB2 de la ARN polimerasa del virus de influenza y estimula su actividad, y su bloqueo genera un efecto negativo en la replicación viral (Chasea *et al.*, 2008).

Ciclofilina. Las ciclofilinas son enzimas celulares, específicamente peptidil-prolil isomerasas, que catalizan la isomerización de los enlaces peptídicos de los residuos de prolina de la configuración *trans-* a la *cis-*, facilitando el plegamiento estructural de las proteínas (Schmid *et al.*, 1995). La ciclosporina y sus derivados se unen a las ciclofilinas con alta afinidad y bloquean su actividad catalítica. Se ha propuesto que la ciclofilina A es capaz de unirse específicamente a la poliproteína gag del VIH-1, asociada con el transporte nuclear del VIH-1, así como participar activamente en diferentes estadios del ciclo de replicación viral, siendo un potencial blanco para compuestos antivirales (Peel *et al.*, 2013). Este modelo antiviral ha sido ensayado contra el VHC, donde se propone que la ciclofilina A y B se unen a la polimerasa NS5B viral, actuando como cofactores para dicha polimerasa, observándose que la inhibición farmacológica de dicha interacción genera una disminución de la replicación viral (Watashi *et al.*, 2005; Lin y Gallay, 2013). Otros autores han sugerido que compuestos inhibidores de la ciclofilina generan una alteración en el tráfico celular de lípidos y en la secreción del vi-

rus de hepatitis C (Anderson *et al.*, 2011). Quing *et al.* (2009) evaluaron, en modelos *in vitro*, el efecto inhibitorio producido por la ciclosporina en virus del género *Flavivirus*, observando que el efecto antiviral estaba asociado al bloqueo de la replicación, ya que interfiere con la interacción de la proteína NS5 de los flavivirus con la ciclofilina A. Pfefferle *et al.* (2011) a través de proteómica, estudiaron la interacción del SARS-Coronavirus con su célula huésped, demostrando la interacción de ciclofilinas con la proteína NSP1 de SARS-CoV y que el uso de inhibidores de ciclofilinas se traduce en una reducción de la replicación. En este sentido las ciclofilinas son un potencial blanco terapéutico que podría ser utilizado como inhibidor de la replicación de los coronavirus, interacción que es susceptible de ser bloqueada por la ciclosporina.

Modificaciones post-transduccionales

Glicosilación. La glicosilación de proteínas esta asociada a la migración viral dentro de los distintos organelos celulares y su maduración hasta la obtención de una proteína funcional. La actividad antiviral de compuestos capaces de inhibir las enzimas asociadas con la glicosilación ha sido evaluada en modelos de virus dengue, donde se conoce que tres de diez proteínas codificadas por dicho virus requieren N-glicosilación para ser funcionales. Entre los compuestos evaluados se encuentra la castanospermina y sus derivados, que han sido analizados en modelos *in vitro* e *in vivo*, observándose resultados promisorios (Sayce *et al.*, 2010). En modelos *in vitro* de hepatitis C también se ha evaluado la actividad inhibitoria de la glicosilación ejercida por derivados inminozúcares de la 1-deoxinojirimicina, la cual ha demostrado tener efecto antiviral al igual que en otros modelos de flavivirus y hepadnavirus (Jacob *et al.*, 2007).

Prenilación. La unión de la molécula de isoprenoide a una proteína se conoce como prenilación de la proteína. Esta modificación regula una variedad de funciones celulares, tales como el crecimiento, diferenciación y la oncogénesis. La producción de mevalonato por 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA) es el paso limitante en la biosíntesis del colesterol. Las estatinas son potentes inhibidores de la HMG-CoA reductasa y son beneficiosos en la prevención de la enfermedad coronaria. Las estatinas también inhiben la prenilación de las proteínas. En diversos modelos *in vitro* se ha evidenciado el efecto de la inhibición de la prenilación por estatinas y su efecto antiviral; uno de ellos es el virus de la hepatitis B (VHB), donde

se observó que la administración de simvastatina generaba un efecto antiviral y que la combinación con lamivudina poseía un efecto sinérgico (Bader *et al.*, 2010). En modelos *in vitro* del virus de la hepatitis Delta, se ha evidenciado que el uso de estatinas tiene un efecto inhibitorio en la formación de la partícula viral (Bordier *et al.*, 2002). Las estatinas se han usado como agente antiviral en la hepatitis C, observándose una reducción del 50% sobre la progresión a carcinoma hepatocelular de pacientes diabéticos infectados por VHC (El-Serag *et al.*, 2009).

Conclusiones y Perspectivas

Las fallas en el tratamiento de patologías virales, así como la existencia de patologías causadas por virus recientemente descubiertos o emergentes, han impulsado el estudio y la investigación de cómo la interacción entre el virus y la célula hospedera puede ser enfocada desde un punto de vista terapéutico, mediante la inhibición selectiva de procesos celulares asociados con el ciclo viral, evitando afectar de manera significativa la homeostasis del hospedero. Por ello, la terapia antiviral dirigida a blancos celulares podría estar dentro de los esquemas terapéuticos contra las infecciones virales donde la terapia tradicional no ha brindado los mejores resultados. La selección de este tipo de blanco genera como ventaja terapéutica el efecto inhibitorio pan-viral, debido a que muchas de las vías metabólicas mencionadas en esta revisión son compartidas por distintos virus. Además, la combinación de la terapia antiviral tradicional con la enfocada en blancos celulares, podría en teoría ofrecer resultados sinérgicos en la inhibición viral. Otra de las ventajas de la terapia enfocada en blancos celulares es que el desarrollo de resistencia mediado por alteración del blanco terapéutico, sería en teoría prácticamente nulo en comparación con la terapia tradicional, ya que la tasa de mutación en el hospedero es significativamente más baja que la del agente viral. Sin embargo, es importante recalcar que el desarrollo de estas terapias antivirales alternativas debe estar sometido a un proceso de investigación exhaustivo en el que se evalúen los diferentes efectos tóxicos asociados al bloqueo farmacológico de estos blancos, ya que dichos compuestos alterarían mecanismos funcionales y pudiesen estar asociado a la aparición de severos efectos adversos. Por esa razón, en teoría esta terapia sería de más fácil implementación en procesos agudos o de corta aplicación, para evitar afectar de manera prolongada las funciones vitales del hospedero. Finalmente, dado el enorme potencial de mutar de los virus, no se debe descartar la aparición de variantes virales resistentes

que evolucionen al uso de mecanismos metabólicos alternativos, menos dependientes del blanco celular sujeto a inhibición.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a José L. Zambrano por su colaboración en el diseño de las figuras y a Rossana Jaspe por su valiosa colaboración en la edición del manuscrito.

REFERENCIAS

- Acosta EG, Bruttomesso AC, Bisceglia JA, Wachsmann MB, Galagovsky LR, Castilla V (2008) Dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and synthetic derivatives inhibit Junin virus replication in vitro. *Virus Res.* 135: 203-212.
- Alhoot MA, Wang SM, Sekaran SD (2011) Inhibition of dengue virus entry and multiplication into monocytes using rna interference. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1410.
- Agbottah E, de La Fuente C, Nekhai S (2005) Antiviral activity of CYC202 in HIV-1-infected cells. *J Biol Chem.* 280: 3029-3042.
- Anderson LJ, Lin K, Compton T, Wiedmann B (2011) Inhibition of cyclophilins alters lipid trafficking and blocks hepatitis C virus secretion. *Virology.* 418: 329.
- Antonelli G, Turriziani O (2012) Antiviral therapy: old and current issues. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40: 95-102.
- Arbutnot P (2011) MicroRNA-like antivirals. *Biochim. Biophys. Acta* 1809: 746-755.
- Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S (2011) Lysosomotropic agents as HCV entry inhibitors. *Virology.* 418: 163.
- Bader T, Korba B (2010) Simvastatin potentiates the anti-hepatitis B virus activity of FDA-approved nucleoside analogue inhibitors in vitro. *Antiviral Res.* 86: 241-245.
- Barquero A., Alche' L, Coto C (2004) Block of vesicular stomatitis virus endocytic and exocytic pathways by 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin, a tetranortriterpenoid of natural origin. *J. Gen. Virol.* 85: 483-493.
- Bearer EL, Satpute-Krishnan P (2002) The role of the cytoskeleton in the life cycle of viruses and intracellular bacteria: tracks, motors, and polymerization machines. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2: 247-264.
- Bordier BB, Marion PL, Ohashi K, Kay MA, Greenberg HB, Casey JL, Glenn JS (2002) A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* 76: 10465-10472.
- Cai Y, Liu Y, Zhang X (2007) Suppression of coronavirus replication by inhibition of the MEK signaling pathway. *J. Virol.* 81: 446-456.
- Caseiro MM, Nelson M, Diaz RS, Gathe J, de Andrade Neto JL, Slim J, Solano A, Netto EM, Mak C, Shen J, Greaves W, Dunkle LM, Vilchez RA, Zeinecker J (2012) Vicriviroc plus optimized background therapy for treatment-experienced subjects with CCR5 HIV-1 infection: Final results of two randomized phase III trials. *J. Infect.* 65: 326-335.
- Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM (2005) Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308: 643-645.
- Chasea G, Deng T, Fodor E, Leung BW, Mayer D, Schwemmler M, Brownlee G (2008) Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology* 377: 431-439.
- Chukwuka A. Didigu and Robert W. Doms (2012) Novel approaches to inhibit HIV entry. *Viruses* 4: 309-324.
- Coremans G, Snoeck R. (2009) Cidofovir: clinical experience and future perspectives on an acyclic nucleoside phosphonate analog of cytosine in the treatment of refractory and premalignant HPV-associated anal lesions. *Expert Opin. Pharmacother.* 10: 1343-1352.
- Cullen M, Sarkar T, Hamel E, Hartman TL, Watson KM, Buckheit RW Jr, Pannecouque C, De Clercq E, Cushman M (2008) Inhibition of tubulin polymerization by select alkenyldiarylmethanes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 469-473.
- De Clercq E (2013) Antivirals: past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* 85: 727-744.
- Droebner K, Pleschka S, Ludwig S, Planz O (2011) Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 92: 195-203.
- El-Serag HB, Johnson ML, Hachem C, Morgana RO (2009) Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular carcinoma in a large cohort of patients with diabetes. *Gastroenterology* 136: 1601-1608.
- Gao G, Luo H (2006) The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84: 5-14.
- Geller R, Taguwa S, Frydman J (2012) Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1823: 698-706.
- Glushakova S, Dubrovsky L, Grivel J, Haffar O, Bukrinsky M (2000) Small molecule inhibitor of HIV-1 nuclear import suppresses HIV-1 replication in human lymphoid tissue ex vivo: a potential addition to current anti-HIV drug repertoire. *Antiviral Res.* 47: 89-95.
- Gnirrs K, Kühl A, Karsten C, Glowacka I, Bertram S, Kaup F, Hofmann H, Pöhlmann S (2012) Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMRSS2 expression. *Virology* 424: 3-10.
- Haasbach E, Pauli EK, Spranger R, Mitzner D, Schubert U, Kircheis R, Planz O (2011) Antiviral activity of the proteasome inhibitor VL-01 against influenza A viruses. *Antiviral Res.* 91: 304-313.
- Haasnoot J, Westerhout E, Berkhout B (2007) RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.* 25: 1435-1443.
- Hoffmann HH, Kunz A, Simon VA, Palese P, Shaw ML (2011) Broad-spectrum antiviral that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis. *PNAS* 108: 5777-5782.
- Hung J, Chung C, Chang W (2002) Molecular chaperone Hsp90 is important for vaccinia virus growth in cells. *J. Virol.* 76: 1379-1390.
- Jacob JR, Mansfield K, You JE, Tennant BC, Kim YH (2007) natural iminosugar derivatives of 1-deoxynojirimycin inhibit glycosylation of hepatitis viral envelope proteins. *J. Microbiol.* 4: 431-440.
- Jenssen H, Andersen JH, Uhlin-Hansen L, Gutteberg TJ, Rekdal Ø (2004) Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res.* 61: 101-109.
- Kaspari M, Tavalai N, Stamminger T, Zimmermann A, Schilf R, Bogner E (2008) Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. *FEBS Lett.* 582: 666-672.
- Konrad S, Huy RH, Vincenzo C, Spirli C, Saletti G, Schiavon M, Bruttomesso D, Bigler L, Follath F, Pettenazzo A, Baritussio A (2008) Amiodarone alters late endosomes and inhibits SARS coronavirus infection at a post-endosomal level. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39: 142-149.
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D (2003) Apoptosis in hepatitis C. *J. Viral Hepat.* 10: 335-342.
- Kwong A, Rao BG, Jeang K (2005) Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 845-853
- Lin K, Galloway P (2013) Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral Res.* 99: 68-77
- Lindow M, Kauppinen S (2012) Discovering the first microRNA-targeted drug. *J. Cell. Biol.* 199: 407-412.
- Linero F, Scolaro L (2009) Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junin virus replication in vitro. *Virus Res.* 145: 166-170.
- Ludwig S, Wolff T, Ehrhardt C, Wurzer WJ, Reinhardt J, Planz O, Pleschka S (2004) MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett.* 561: 37-43.
- Martin U, Jarasch N, Nestler M, Rassmann A, Munder T, Seitz S, Zell R, Wutzler P, Henke A (2007) Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3. *Apoptosis* 12: 525-553.
- Martínez MA, Gutiérrez A, Armand-Ugón M, Blanco J, Parera M, Gómez J, Clotet B, Esté JA (2002) Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 16: 2385-2390.
- Morris BL, Scott CA, Wilkin TJ, Sax PE, Gulick RM, Freedberg KA, Schackman BR (2012) Cost-effectiveness of adding an agent that improves immune responses to initial antiretroviral therapy (ART) in HIV-infected patients: guidance for drug development. *HIV Clin. Trials* 13: 1-10.
- Orba Y, Sunden Y, Suzuki T, Nagashima K, Kimura T, Tanaka S, Sawa H (2008) Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitine suppresses JC virus proliferation. *Virology* 370: 173-183.
- Ölschläger S, Neyts J, Günther S (2011) Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus. *Antiviral Res.* 91: 89-93.
- Peel M, Scribner A (2013) Cyclophilin inhibitors as antiviral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 4485-4492.
- Pinto R, Herold S, Cakarova L, Hoegner K, Lohmeyer J, Planz O, Pleschka S (2011) Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 92: 45-56.
- Pfefferle S, Schöpf J, Kögl M, Friedel CC, Müller MA, Carbajo-Lozoya J, Stellberger T, von Dall'Armi E, Herzog P, Kallies S, Niemeyer D, Ditt V, Kuri T, Züst R, Pumpor K, Hilgenfeld R, Schwarz F, Zimmer R, Steffen I, Weber F, Thiel V, Herrler G, Thiel HJ, Schwegmann-Wessels C, Pöhlmann S, Haas J, Drosten

- C, von Brunn A (2011) The SARS-coronavirus-host interactome: Identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* 7: 1002331.
- Pleschka S (2008) RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol. Chem.* 389: 1273-1282.
- Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, Tang H, Shi PY (2009) Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3226-3235.
- Raghu H, Sharma-Walia N, Veettil MV, Sadagopan S, Chandran B (2009) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J. Virol.* 83: 4895-4911.
- Savarino A, Gennero L, Chen HC, Serrano D, Malavasi F, Boelaert JR, Sperber K (2001) Anti-HIV effects of chloroquine: mechanisms of inhibition and spectrum of activity. *Aids* 15: 2221-2229.
- Sayce A, Miller J, Zitzmann N (2010) Targeting a host process as an antiviral approach against dengue virus. *Trends Microbiol.* 18: 323-330.
- Schang L (2002) Cyclin-dependent kinases as cellular targets for antiviral drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 779-792.
- Schang L (2004) Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1697: 197-209.
- Schmid FX (1995) Protein folding: Prolyl isomerases join the fold. *Curr. Biol.* 5: 993-994.
- Shah PP, Wang T, Kaletsky RL, Myers MC, Purvis JE, Jing H, Hury DM, Greenbaum DC, Smith AB, Bates P, Diamond SL (2010) A small-molecule oxocarbazate inhibitor of human cathepsin L blocks severe acute respiratory syndrome and Ebola pseudotype virus infection into human embryonic kidney 293T cells. *Mol. Pharmacol.* 78: 2319-2324.
- Smith DR, McCarthy S, Chrovian A, Olinger G, Stosel A, Geisbert TW, Hensley LE, Connor JH (2010) Inhibition of heat-shock protein 90 reduces Ebola virus replication. *Antiviral Res.* 87: 187-194.
- Torres NI, Castilla V, Bruttomesso AC, Eiras J, Galagovsky LR, Wachsmann MB (2012) In vitro antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs and ERK modulators against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 95: 37-48.
- Tran K, Mahr JA, Spector DH (2010) Proteasome subunits relocalize during human cytomegalovirus infection, and proteasome activity is necessary for efficient viral gene transcription. *J. Virol.* 84: 3079-3093.
- Vincent MJ, Bergeron E, Benjannet S, Erickson BR, Rollin PE, Ksiazek TG, Seidah NG, Nichol ST (2005) Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology* 339: 72-83.
- Wang B, Zhang H, Zhu M, Luo Z, Peng Y (2012) MEK1-ERKs signal cascade is required for the replication of enterovirus 71 (EV71). *Antiviral Res.* 93: 110-117.
- Wang Q, Bushell S, Qing M, Xu HY, Bonavia A, Nunes S, Zhou J, Poh MK, Florez de Sessions P, Niyomrattanakit P, Dong H, Hoffmaster K, Goh A, Nilar S, Schul W, Jones S, Kramer L, Compton T, Shi PY (2011) Inhibition of dengue virus through suppression of host pyrimidine biosynthesis. *J. Virol.* 85: 6548-6556.
- Watanabe H, Tanaka Y, Shimazu Y, Sugahara F, Kuwayama M, Hiramatsu A, Kiyotani K, Yoshida T, Sakaguchi T (2005) Cell-specific inhibition of paramyxovirus maturation by proteasome inhibitors. *Microbiol. Immunol.* 49: 835-844.
- Watahi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* 19: 111-122.
- Zhang H, Feng H, Luo L, Zhou Q, Luo Z, Peng Y (2010) Distinct effects of knocking down MEK1 and MEK2 on replication of herpes simplex virus type 2. *Virus Res.* 150: 22-27.

CELLULAR TARGETS AS AN ALTERNATIVE MECHANISM IN ANTIVIRAL THERAPY

Joseph T. Ortega, Héctor R. Rangel and Flor H. Pujol

SUMMARY

Complications arising from infections caused by viral pathogens and development of resistance have led to the relentless pursuit of new strategies and compounds that may be used in the antiviral therapy. One of these is the antiviral therapy focused on cellular targets (TFCT), which is based on the parasitic condition of virus with its host. The temporary blockade of cellular processes associated with the viral replication cycle, can lead to a collapse of the latter. This review is part of this alternative vision of antiviral therapy, showing examples, potential cellular

targets and their regulatory compounds, which have been evaluated in viral models. In the future, TFCT will probably be in the therapeutic regimens against various viral diseases, based on the possible synergistic effect that would be obtained when combined with traditional antiviral therapy in addition to the theoretical advantage of obtaining a pan-antiviral effect and a low mutation rate on target. However, it is necessary to develop and apply theoretical and practical models, in order to assess its effectiveness and possible toxic effects to the host.

ALVOS CELULARES COMO MECANISMO ALTERNATIVO NA TERAPIA ANTIVIRAL

Joseph T. Ortega, Héctor R. Rangel e Flor H. Pujol

RESUMO

As complicações que derivam das infecções causadas por patógenos virais e o desenvolvimento de resistência por parte destes últimos têm levado à incessante busca de novas estratégias e novos compostos que possam ser utilizados na terapia antiviral. Uma destas estratégias é a terapia antiviral dirigida a alvos celulares (TEBC), a qual está baseada na condição parasitária do vírus com o seu hospedeiro. O bloqueio temporal de processos celulares associados ao ciclo de replicação viral pode provocar, neste último, um colapso. Nesta revisão se enquadra dita visão alternativa da terapia antiviral, demonstrando com exemplos os possíveis alvos celulares e seus respectivos

compostos e mecanismos reguladores, os quais têm sido avaliados em modelos virais. A TEBC provavelmente estará, em um futuro, nos esquemas terapêuticos contra diversas afecções virais, fundamentados no possível efeito sinérgico que se obteria ao combiná-la com a terapia antiviral tradicional, além da vantagem teórica em obter um efeito pan-antiviral e uma praticamente nula taxa de mutação no alvo. No entanto, é necessário desenvolver e aplicar modelos teórico-práticos, que permitam avaliar sua eficácia e seus possíveis efeitos tóxicos para o hospedeiro.