



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: REPOSICIONAMIENTO DE
FÁRMACOS EN LA LUCHA FRENTE A VIRUS
EMERGENTES

Autor: Sandra Martín Muñoz

Fecha: Junio 2020

Tutor: Beatriz Pacheco González

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
MATERIALES Y MÉTODOS	4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
1. Ébola (Ébola virus)	4
1.1. Etiología (virología)	
1.2. Epidemiología	
1.3. Patogenia	
Mecanismo de acción	
1.4. Diagnóstico	
1.5. Tratamiento	
2. Zika	7
2.1. Etiología (virología)	
2.2. Epidemiología	
2.3. Patogenia	
Mecanismo de acción	
2.4. Diagnóstico	
2.5. Tratamiento	
3. Reposicionamiento de fármacos frente a Zika y Ébola	9
3.1. Sofosbuvir	10
Estructura y características principales	
Mecanismo de acción	
Ensayos en el Zika	
Ensayos propuestos para el Ébola	
3.2. Suramina	13
Características principales	
Estructura y mecanismo de acción	
Ensayos en el Zika	
Ensayos en el Ébola	
3.3. Novobiocina	16
Características principales	
Mecanismo de acción	
Ensayos en el Zika	
CONCLUSIÓN	18
BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

Los virus emergentes representan un grave problema de salud pública, y para la mayoría no existe tratamiento o este es insuficiente. Los brotes recientes refuerzan la necesidad urgente de encontrar nuevos tratamientos antivirales. El reposicionamiento de fármacos supone una alternativa al descubrimiento de fármacos de *novo* que permite reducir el coste y el tiempo necesario para la autorización de una nueva indicación. En este trabajo se describen diversos fármacos con potencial para tratar las enfermedades ocasionadas por dos virus emergentes: el virus del Ébola y el del Zika.

Palabras clave: “reposicionamiento de fármacos”, “virus emergentes”, “Ébola” y “Zika”.

INTRODUCCIÓN

El número de virus existentes capaces de desencadenar una enfermedad en el ser humano es inconmensurable y la mayor parte no tienen tratamiento. Los virus emergentes al igual que los reemergentes, son considerados un problema de salud pública. En la Tabla 1 se resumen los principales brotes recientes.

Virus	Periodo (años)	Nº de casos	Continentes	Nº total de países
Zika virus	2013-2018	>220.000	África, América y Asia	85
Virus de la Fiebre del Valle de Rift	2013-2018	>1.000	África y Asia	31
Virus del Ébola	2014-2018	>28.9000	África	6
MERS-CoV	2012-2017	>2.200	África, América, Asia y Europa	27
SARS-CoV	2002-2003	>8.000	África, América, Asia y Europa	30
SARS-CoV-2	2019-	>2.600.000	África, América, Asia, Europa y Oceanía	
Influenza virus	Epidemias anuales	3-5 millones/año	Todo el mundo	
Chikungunya virus	2013-2018	>2 millones	África, América, Asia, Europa y Oceanía	112
Dengue virus	Epidemias anuales	390 millones/año	África, América, Asia, Europa y Oceanía	111
Virus de la Fiebre Amarilla	2013-2018	>15.000	África y América	44
Virus del Nilo Occidental	2013-2018	2.500 al año (12.000 en total)	África, América, Asia, Europa y Oceanía	83
CCHFV	2000-2015	>1.000	África, Asia y Europa	42
SFTSV	2009-2016	1.500 al año	Asia	4

Tabla 1: Clasificación de los principales virus emergentes en función del número de casos y su distribución geográfica en la última década. Las siglas MERS-CoV corresponden a Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio, SARS-CoV a Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV), SARS-CoV-2 a Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, CCHFV a Virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo y SFTSV a Virus de la Fiebre Severa con Síndrome Trombocitopénico. Adaptado de (1).

La aparición de estos microorganismos con fácil capacidad de propagación y potencial para el desencadenamiento de una pandemia se ve favorecida por el incremento del número de

viajes internacionales, migraciones, globalización del comercio, de la tecnología, industria, del desarrollo de la agricultura o del cambio climático (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recalcado la necesidad urgente de controlar estos microorganismos, incluyendo las cepas resistentes. Tras la reunión por parte de un comité de expertos de esta organización en diciembre de 2015, se publicó una lista con las enfermedades causadas por virus emergentes que presentan mayores posibilidades de causar epidemias y que, o bien no tienen tratamiento, o bien el mismo es insuficiente. Entre dichas enfermedades se encuentran: la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo, Ébola, Fiebre Hemorrágica de Marburgo, Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS), Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), la Fiebre Lassa, enfermedad por el virus de Nipah, Fiebre Severa con Síndrome Trombocitopénico (FSST), Fiebre del Valle del Rift, Chikungunya, y Zika (2). En diciembre de 2019 en la ciudad china de Wuhan surgen una serie de casos de neumonía severa cuyo agente etiológico corresponde a un nuevo coronavirus, conocido ahora como SARS-CoV-2. En marzo de 2020 la OMS declaró el nivel de pandemia (3).

Con estos antecedentes, se plantea como objetivo encontrar nuevos antivirales capaces de emplearse en el tratamiento de estas enfermedades. Existen, por ejemplo, **agentes antivirales directos** (AAD) que bloquean una proteína viral con lo cual son capaces de impedir la infección del virus como el de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) o el virus de la hepatitis C (VHC), pero el fin ideal sería buscar **antivirales de amplio espectro**, ya que éstos, a diferencia de los anteriores, reducirían el tiempo y el coste que suponen los primeros estadios del desarrollo de un fármaco de novo. Al ser de amplio espectro, podrían usarse fuera de su indicación principal, haciendo frente a virus emergentes, e incluso empleándose como alternativa en caso de urgencia antes de conocer cuál es el virus causante de la patología que presenta el paciente (4).

Uno de los métodos para encontrar antivirales capaces de tratar enfermedades causadas por virus emergentes es el **reposicionamiento**, que consiste en el uso de un fármaco para tratar una enfermedad distinta de aquella para la cual fue diseñado. Este proceso presenta ventajas e inconvenientes frente a la estrategia tradicional de desarrollar nuevos fármacos.

Entre las **ventajas** del reposicionamiento se encuentran:

- Requiere menor coste y tiempo.
- Posibilita la no realización de ensayos preclínicos (en animales de experimentación) para realizar directamente ensayos clínicos de fase 2, ya que se conocen los efectos secundarios, posología, el perfil de seguridad y las interacciones farmacológicas del mismo.
- Tiene potencial para usarse en terapias combinadas con la posibilidad de reducir o retrasar las resistencias asociadas al empleo de la monoterapia.
- A menudo los análogos (junto con su correspondiente información farmacológica) ya están disponibles para poder realizar ensayos clínicos.
- Las cadenas de manufacturación y formulación ya se encuentran establecidas para la producción a gran escala por lo que se evitan los costes del lanzamiento.

Los **inconvenientes** del reposicionamiento son los siguientes:

- La identificación de dianas puede ser un proceso enrevesado y los fármacos identificados pueden presentar polifarmacología.
- Debido a las altas dosis empleadas en los screenings, cabe la posibilidad de que se identifiquen erróneamente sustancias tóxicas como fármacos activos.
- A menudo la concentración de fármaco eficaz es mayor de la que se puede alcanzar en plasma.
- El diseño de nuevos análogos más potentes ocasiona la pérdida de su potencial como posible fármaco de reposicionamiento porque habría que efectuar tanto ensayos preclínicos como clínicos para comprobar su efectividad y su seguridad.
- Los fármacos identificados a menudo se encuentran bajo propiedad intelectual y/o programas que los hacen inviables o poco atractivos para otras compañías farmacéuticas que podrían encargarse del desarrollo más extenso y del coste de los ensayos clínicos.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión de fármacos candidatos al reposicionamiento frente a los virus del Ébola y del Zika.

MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica en las bases de datos “Pubmed” y en Clinicaltrials.gov, en la página web oficial de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la búsqueda de información se han utilizado las palabras clave mencionadas anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ÉBOLA (Ébola virus)

1.1. Etiología (virología)

Dentro de la familia de virus Filoviridae, se encuentra el género Ebolavirus al que pertenecen 5 especies: *ebolavirus Bundibugyo* (BDBV), *Ebola virus* (EBOV antes conocido con el nombre de *ebolavirus Zaire*), *ebolavirus de Sudan* (SUDV), *Ebolavirus Reston* (RESTV) y *Ebolavirus Tai Forest* (TAFV). Diversas especies de murciélagos se consideran el reservorio natural que pueden transmitir estos virus a otros animales, como simios o antílopes. El ser humano puede infectarse mediante la ingesta de estos animales infectados. La transmisión de este virus es persona a persona por contacto directo con sangre, secreciones y semen (5). Además, si las instalaciones médicas de las que se dispone son limitadas, existe un alto riesgo añadido de contagio de este tipo de enfermedades de transmisión hemática.

1.2. Epidemiología

Los Ebolavirus son responsables de la enfermedad conocida como fiebre hemorrágica del Ébola, que cursa con síntomas como fiebre, fatiga, artralgia, mialgia, malestar, así como con

manifestaciones hemorrágicas. Estas manifestaciones clínicas pueden poner en riesgo la vida del individuo, pudiendo desembocar en shock séptico, acidosis metabólica, fallo orgánico e incluso ocasionar la muerte (6). Las especies BDBV, SUDV y EBOV se han asociado a grandes brotes en el continente africano, siendo este último el agente etiológico del brote acontecido en África entre los años 2013-2016, con un total de 28.000 casos confirmados y 11.000 fallecimientos. La tasa de mortalidad es mayor en hombres que en mujeres, presentando mayor frecuencia en niños y en adultos con edades por encima de 40 años y sobre todo es muy elevada en mujeres embarazadas (6).

1.3. Patogenia

Son virus que tienen como material genético un ARN monocatenario de sentido negativo (ARNmc (-)) constituido aproximadamente por unas 19 kilobases (kb). Su genoma contiene 7 genes (Figura 1) y cada uno codifica para una proteína, con la excepción de GP que codifica para 3 glicoproteínas:

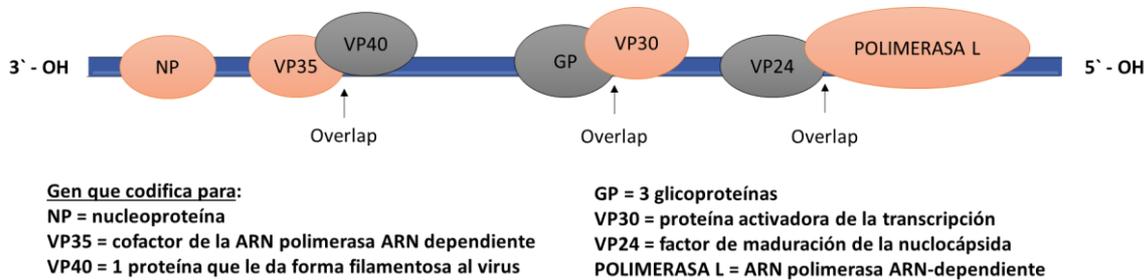


Figura 1: Estructura del genoma del virus del ébola. El conjunto de NP, VP35, VP30, VP24, RdRp junto con el ARN genómico recibe el nombre de complejo ribonucleoproteico.

Ensayos *in vivo* en primates han demostrado que el Ébola es capaz de infectar a células endoteliales, adrenales, hepatocitos, células dendríticas, monocitos y macrófagos (7). Esta amplia diversidad se debe a que estas células presentan diferentes proteínas con las que el microorganismo puede interactuar como son las lectinas de tipo C, glicosaminoglicanos, dominios de inmunoglobulina y mucina de los linfocitos T y con receptores TAM (Tyro3, Axl, Mer). La interacción con estas proteínas permitirá al virus entrar en las células del huésped como se detalla a continuación.

Mecanismo de acción: Las 3 glicoproteínas virales codificadas por el gen GP son la GP1, GP2 y la sGP, ésta última se hipotetiza que participa en la evasión del sistema inmune, mientras que GP1 interactúa con las proteínas de la célula del huésped, dando lugar a la entrada en la célula mediante un proceso de macropinocitosis. En el endosoma celular, las catepsinas van a actuar sobre GP1 y GP2, permitiendo la unión al receptor de Niemann Pick C1 (NPC1) de la membrana endosomal, produciéndose la fusión de las membranas del virus y del endosoma, permitiendo la salida al citoplasma del contenido viral (8).

Posteriormente ocurren los siguientes pasos, recogidos en la figura 2. En el citoplasma celular se produce la transcripción del material genético utilizando como molde la cadena de ARNmc (-). En este proceso, una fosfatasa desfosforila la proteína VP30, se produce la unión entre VP35 y NP, y junto a la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) se produce la transcripción dando lugar al ARN monocatenario de sentido positivo (ARNmc (+)). A continuación, se

incorpora una caperuza en el extremo 5` y se produce la poliadenilación en el extremo 3`. Ese ARNm es el que sufre el proceso de traducción.

Cuando se fosforila VP30 se inhibe el proceso de transcripción y tiene lugar la replicación del ARNm (-), por el que se sintetiza una cadena de ARNm (+) que sirve a su vez como molde para sintetizar ARNm (-). Finalmente se produce el ensamblaje del ARNm (-) junto con las proteínas virales, se libera el virus de la célula y comenzaría el ciclo de nuevo (8).

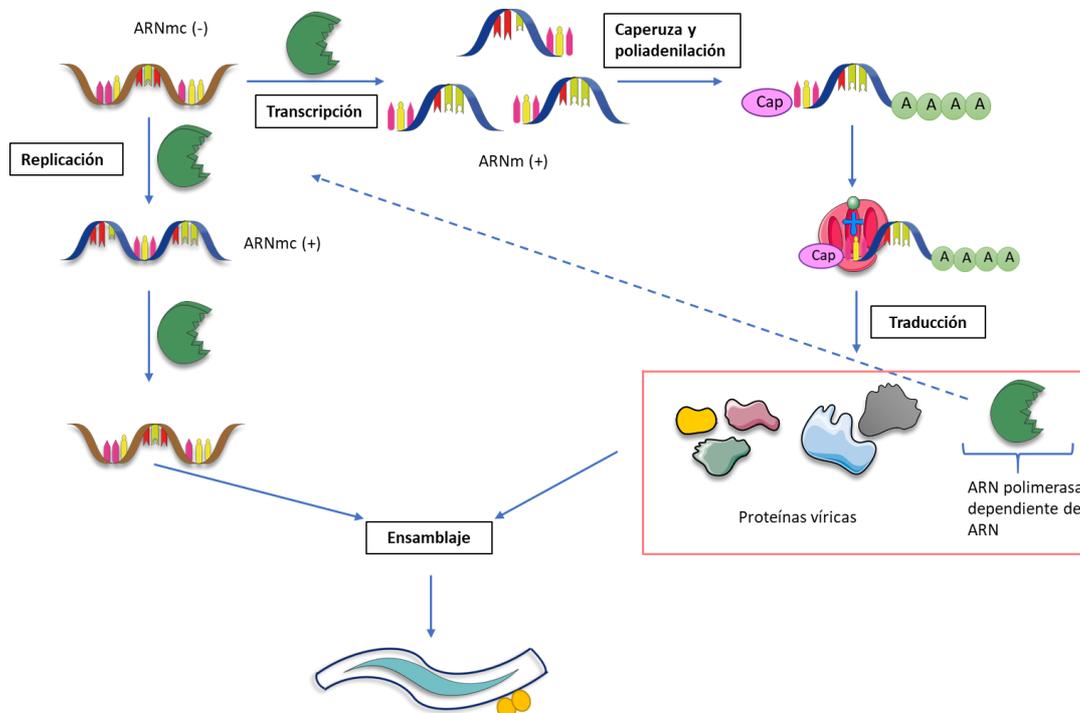


Figura 2: Esquema del ciclo de replicación del virus del ébola en una célula huésped. Los pasos de este proceso se describen con detalle en el texto.

1.4. Diagnóstico

Dentro de los pacientes que logran sobrevivir al virus, algunos desarrollan un cuadro clínico crónico similar a la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondiloartritis o uveítis. Es importante tener en cuenta que el virus permanece durante un periodo prolongado en determinados fluidos corporales, como el semen, incluso en pacientes que han superado la infección incluso el año anterior, lo cual supone un potencial riesgo de transmisión (6).

El método diagnóstico de referencia es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (q-PCR) (9). Los virus causantes de fiebres hemorrágicas se manejan con los estándares de bioseguridad más elevados, que corresponden al nivel 4 (BSL-4). Este nivel de contención biológica se emplea en aquellas muestras que suponen un elevado riesgo de causar enfermedades potencialmente mortales para las cuales no existe ni vacunas ni tratamiento.

1.5. Tratamiento

Hoy en día no se dispone de fármacos que curen esta enfermedad, por lo que se recurre a medidas de soporte vital. Entre otras alternativas, se ha evaluado la efectividad de la

administración de plasma de enfermos convalecientes para tratar las infecciones causadas por EBOV, aunque no se ha observado una mejora significativa de la supervivencia (10). Por otra parte, en noviembre de 2019 la Agencia Europea del Medicamento (EMA) concedió una autorización condicional a Ervebo®, una vacuna creada por la compañía Merck, que contiene el virus de la estomatitis vesicular atenuado modificado para contener la proteína GP del Ébola virus, de administración en dosis única. La modalidad de esta autorización implica que se espera obtener más información acerca de ciertos aspectos del procedimiento de fabricación (11). Esta vacuna fue aprobada en diciembre de 2019 por la Food and Drug Administration (FDA).

2. ZIKA

2.1. Etiología (virología)

El virus Zika pertenece a la familia Flaviviridae y está relacionado con otros arbovirus como el virus del Dengue, Fiebre Amarilla y Chikungunya. Este microorganismo se transmite principalmente mediante la picadura de las hembras de los mosquitos *Aedes aegypti* aunque también pueden actuar como vectores *Aedes albopictus* y *Aedes polynesiensis*. La infección inicial suele afectar a las células de la piel como los fibroblastos, queratinocitos y las células dendríticas inmaduras.

Al igual que el Ébola, este virus presenta transmisión persona-persona mediante transfusiones de sangre, trasplante de órganos, transmisión vertical (transplacentaria, en el parto y durante la lactancia) y por vía sexual (12).

2.2. Epidemiología

A 4 de enero de 2018 existían 223.477 casos confirmados en todo el mundo, pero el número real de infectados es más elevado, ya que el 80% de los pacientes que presentan infección son asintomáticos (13). El periodo de incubación es de 3-14 días y el periodo sintomático es de 2-7 días.

Entre los síntomas que se han descrito se encuentran fiebre, dolor de cabeza, malestar general, mareo, dolor estomacal, anorexia, artralgia, conjuntivitis y sarpullido macropapular. Además, puede provocar malformaciones fetales, microcefalia, parto prematuro, aborto espontáneo o muerte intrauterina. Excepcionalmente, se ha asociado con casos del síndrome de Guillain-Barre (SGB), enfermedad autoinmune rara en la cual el sistema inmune ataca a los nervios periféricos (polineuropatía periférica) produciendo debilidad, entumecimiento y hormigueo de las extremidades, con parálisis progresiva de evolución rápida que puede ocasionar la muerte (14). Debido a las complicaciones neurológicas, la OMS declaró la emergencia de salud pública de importancia internacional en febrero de 2016.

2.3. Patogenia

El genoma del virus Zika consta de 10.794 kb y está constituido por una molécula de ARNm (+) que presenta dos regiones no codificantes (UTR), tal y como se muestra en la figura 3:

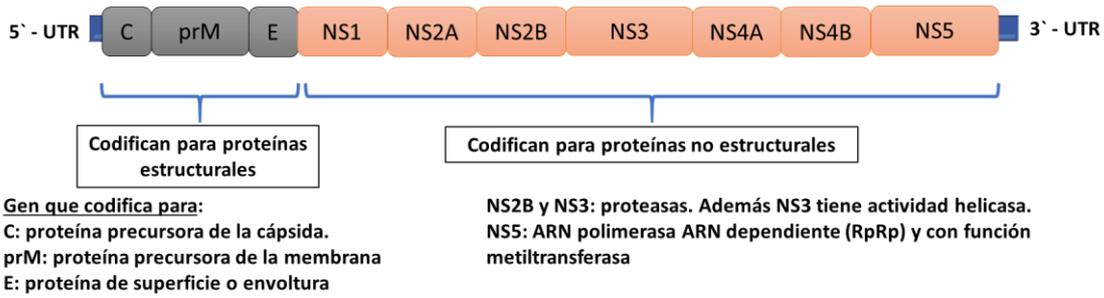


Figura 3: Estructura del genoma del virus del Zika.

Mecanismo de acción: En primer lugar, la proteína de superficie E del virus reconoce los receptores de la célula del huésped, especialmente receptores Axl, aunque también es capaz de reconocer Tyro3, DC-SIGN (receptor de lectina tipo C) y, en menor medida, los TIM-1. La interacción da lugar a su endocitosis (15). La acidez del endosoma induce un cambio de conformación de la proteína E, produciéndose la fusión de la membrana endosomal con la envoltura del virus y, finalmente, la liberación del ARNmc (+) viral al citoplasma. Como se observa en la figura 4, este ARN sufre un proceso de traducción en la membrana del retículo endoplasmático (RE), obteniéndose una poliproteína que se escinde por acción de proteasas tanto celulares como del virus del Zika, esta última está compuesta por dos proteínas no estructurales, NS2B y NS3, muy conservadas en las cepas del virus Zika, por lo que esta proteasa NS2B-NS3 se considera una potencial diana terapéutica.

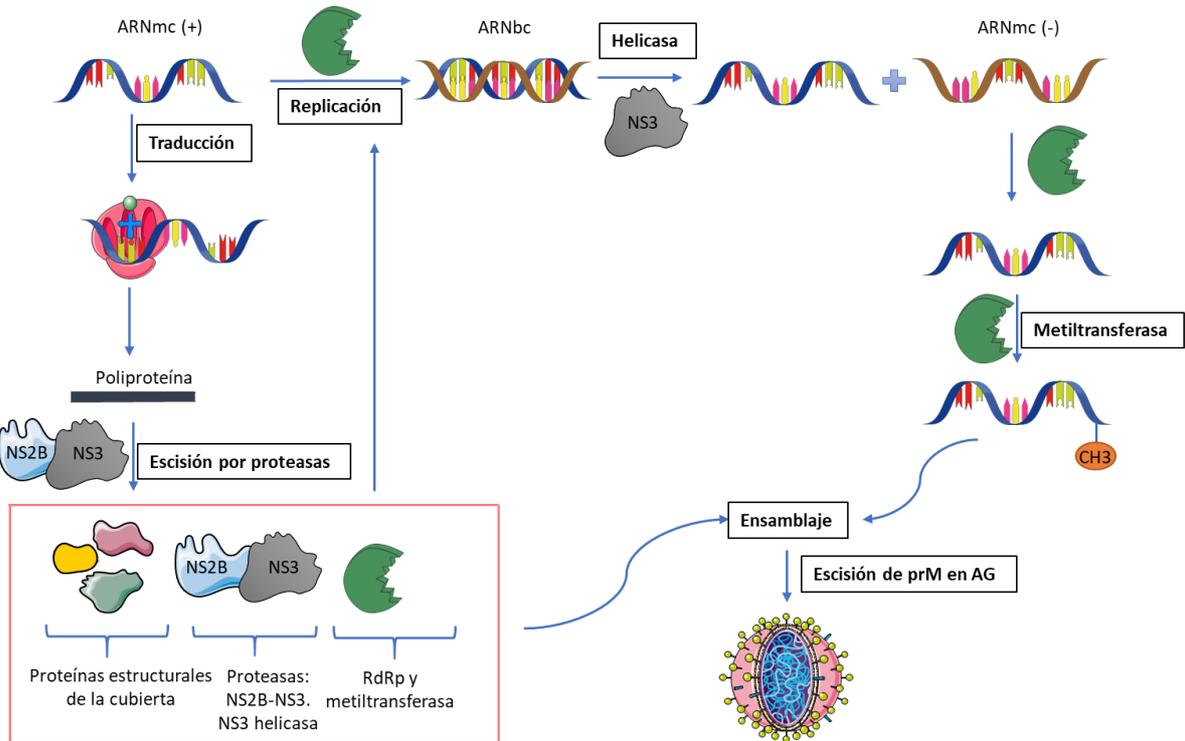


Figura 4: Esquema del ciclo de invasión y replicación del virus del Zika en una célula huésped. Los pasos de este proceso se describen con detalle en el texto.

Por otra parte, se lleva a cabo la replicación del genoma del virus, que tiene lugar en la membrana del RE, mediante la formación de un complejo constituido por las proteínas no

estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La proteína NS5 tiene en su extremo C-terminal actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), por lo que se encarga de replicar el ARNmc (+), obteniendo un ARN bicatenario (ARNbc). A continuación, la proteína NS3, que en su extremo C-terminal presenta actividad helicasa, se encarga de separar las dos hebras del ARNbc en ARNmc (+) y ARNmc (-). El ARNmc (-), que es más pequeño que el de sentido positivo al carecer de la caperuza metilada, se usa como molde para la obtención de copias de ARNmc (+), que posteriormente serán metiladas por la actividad metiltransferasa del extremo N-terminal de la proteína NS5. Tras este proceso, se produce el ensamblaje del genoma junto a las proteínas que participan en la replicación y con las proteínas estructurales prM, C y E en una forma inmadura que entra en el Aparato de Golgi (AG) (16).

Gracias al pH ácido del AG, se induce una reorganización del heterodímero de las proteínas E-prM, de forma que se produce un despliegue de homodímeros de E paralelamente a la superficie viral. Esta reorganización induce escisión de la proteína prM por la furin proteasa de la célula huésped, obteniendo así el virus maduro e induciendo su exocitosis (16).

2.4. Diagnóstico

El método diagnóstico de referencia, al igual que sucede con el Ébola, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real Trioplex (Trioplex q-PCR), que permite detectar y diferenciar el ARN de los virus del Chikungunya, del Dengue y del Zika en muestras de sangre, orina e incluso en los líquidos cefalorraquídeo y amniótico (17). Las ecografías permiten detectar alteraciones cerebrales y microcefalias en el feto durante el segundo o al comienzo del tercer trimestre de embarazo.

2.5. Tratamiento

A día de hoy, no existe vacuna ni tratamiento, se emplean medidas de soporte vital. En cuanto a la profilaxis, se recomienda el uso de repelentes de mosquitos, mosquiteras, insecticidas, esterilizar a los machos. Fomentar la cría de las larvas del mosquito *Toxorhynchites splendens* que se alimenta sobre todo de las larvas del vector *Aedes aegypti* puede ser una alternativa para reducir la propagación de estas especies (18).

3. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS FRENTE A ZIKA Y ÉBOLA

Nombre del fármaco	Indicación que tiene aprobada	Diana de la indicación	Virus emergente	Diana contra el virus
Sofosbuvir	Antiviral para VHC	RdRp	Ébola Zika	RdRp
Suramina	Antiparasitario para Trypanosoma brucei rhodesiense	Diversas enzimas de la glucólisis	Zika Ébola	Entrada NS3 (helicasa) Glicosaminoglicanos
Novobiocina	Antibacteriano Diagnóstico	ADN girasa	Zika	Proteasa NS2B-NS3

Tabla 2: Clasificación y resumen de los fármacos de los que se va a hablar.

3.1. SOFOSBUVIR

Estructura y características principales

El Sofosbuvir es un antiviral aprobado para el tratamiento de la hepatitis C, causado por el virus de la hepatitis C (VHC) que pertenece, al igual que el virus del Zika, a la familia Flaviviridae. Sofosbuvir es un profármaco de tipo fosoramidato, análogo del nucleósido uridina y de carácter lipófilo, que evita el paso de nucleósido a nucleótido monofosfato para bioactivarse selectivamente en el hígado, siendo su forma activa la trifosforilada (Figura 5).

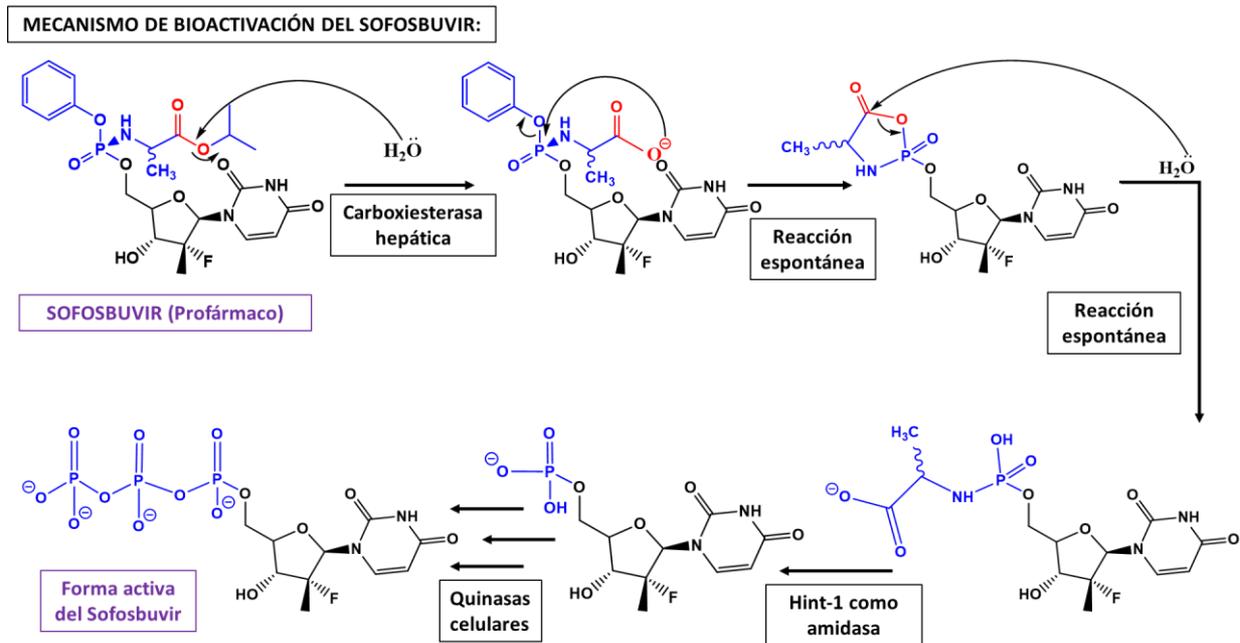


Figura 5: mecanismo de bioactivación del Sofosbuvir en el hígado.

Los ensayos clínicos para su comercialización como tratamiento para el VHC junto a los estudios post-comercialización, demostraron un buen perfil de seguridad del fármaco. Entre los efectos adversos notificados destacan náuseas, dolor de cabeza, mareos, fatiga y dolor abdominal. No se ha encontrado que exista una toxicidad dosis dependiente, pero se desaconseja su uso durante el periodo de lactancia y se desconoce su eficacia y seguridad en pediatría. Está clasificado por la FDA como un fármaco de clase B, no suponiendo un riesgo en el embarazo, aunque no existe la confirmación en mujeres (19).

Al ser sustrato de la glicoproteína P no se recomienda su administración conjunta con inductores de dicha glucoproteína (como Carmabazepina, Oxcarbamazepina, Fenitoína o Fenobarbital, entre otros).

Mecanismo de acción

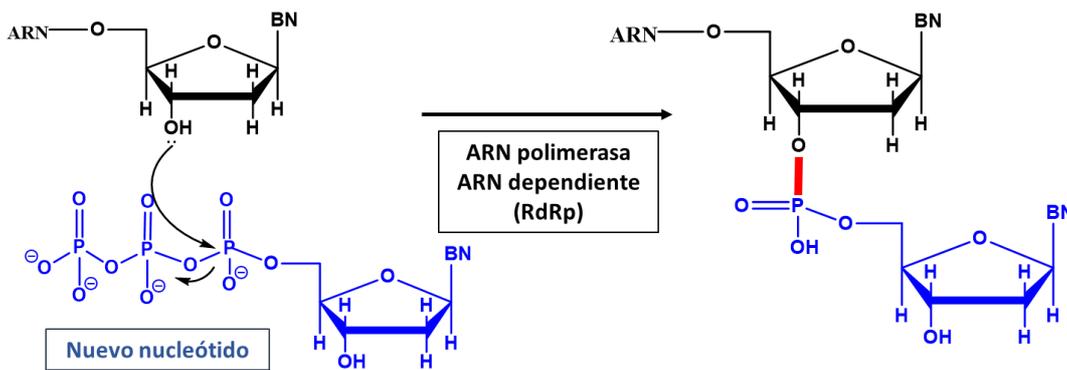
Este fármaco se caracteriza por tener como diana la proteína más conservada entre los miembros de la familia Flaviviridae, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El extremo C-terminal de esta enzima presenta aproximadamente un 80% de residuos aminoácidos conservados entre los virus miembros de la familia Flaviviridae, siendo el lugar donde se une el Sofosbuvir. Además, el fármaco establece interacciones con los 2 cationes de

magnesio (Mg^{+2}) presentes en el sitio activo y que resultan necesarios para la polimerización de ribonucleótidos. Otras características que convierten a esta enzima en una buena diana terapéutica es que su inhibición detiene la replicación viral y que, al no existir una proteína similar en los seres humanos, no ocasionaría toxicidad.

Se ha considerado el empleo de este fármaco como reposicionamiento en el Ébola, ya que sus RdRp presentan muchas semejanzas. En el caso de este virus, además de producirse el proceso de replicación tiene lugar el proceso de transcripción, ambos mediados por la RdRp. En la enzima se distinguen 3 regiones: los dedos, la palma y el pulgar. El lugar de acción del Sofosbuvir es en la palma, un área importante para la incorporación de nuevos nucleótidos a la nueva hebra de ARN. En la figura 6 se muestra el mecanismo de acción de la ARN polimerasa en condiciones normales (mecanismo sin inhibidor) y con Sofosbuvir (mecanismo con inhibidor).

MECANISMO SIN INHIBIDOR DE LA ARN POLIMERASA ARN DEPENDIENTE (RdRp)

Cadena de ARN en crecimiento



MECANISMO CON INHIBIDOR

Cadena de ARN en crecimiento

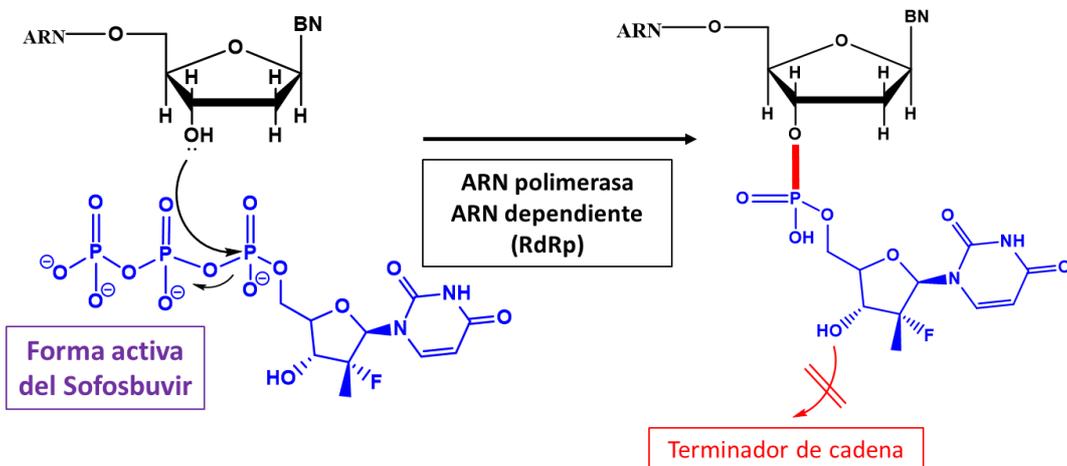


Figura 6: Mecanismo sin inhibidor y con inhibidor de la RdRp.

Este fármaco es un inhibidor competitivo por lo que compite con los nucleótidos para incorporarse a la nueva cadena de ARN y, a pesar de la presencia en su estructura química del radical OH en 3', el Sofosbuvir actúa como terminador de cadena.

Ensayos en el Zika

Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que el Sofosbuvir es capaz de inhibir directamente la polimerasa del Zika en las líneas celulares de células de hepatoma (Huh-7), células de neuroblastoma (SH-Sy5y) y en células del riñón de hámster (BHK-21), presentando una eficacia 5 veces superior en células Huh-7 y dos veces en células SH-Sy5y en comparación con la línea BHK-21 (20).

También se ha confirmado el efecto neuroprotector *in vitro* del Sofosbuvir en un modelo celular de estadios iniciales del desarrollo cerebral, al observarse una inhibición de la replicación del virus tras el tratamiento de células madre neuronales (NSCs), así como una reducción pronunciada de la carga viral. Se ha observado que el fármaco puede bioactivarse en células madre neuroepiteliales (20).

Se han realizado ensayos *in vivo* para evaluar la eficacia del fármaco para evitar la transmisión vertical en ratones, observándose buena tolerancia, así como la inhibición de la replicación del virus en hembras embarazadas sin implicar una transmisión vertical. Los resultados sugieren que el fármaco podría usarse para tratar el Zika a la misma dosis a la que se usa para tratar la hepatitis causada por VHC. Además, existe la posibilidad de que el tratamiento con este fármaco podría prevenir el desarrollo de otras manifestaciones clínicas como la uveítis, mielitis aguda, meningoencefalitis o el síndrome de Guillain-Barré (21).

Ensayos propuestos para el Ébola

Se han establecido varias líneas de propuestas por Sandra E. Reznik y col. (22) para evaluar la eficacia del Sofosbuvir en el tratamiento frente al Ébola. En ellas, y previamente a la realización de ensayos clínicos, sería preciso evaluar la eficacia *in vitro* en cultivos de macrófagos y de células Huh-7 infectadas con Ébola. En el caso de que se demuestre la eficacia, se requerirían ensayos posteriores *in vivo* en primates infectados con el virus y, en el caso de obtener resultados positivos, finalmente se pasaría a determinar la eficacia en humanos.

Como ya se ha mencionado anteriormente en el texto, debido a que el Ébola puede permanecer mucho tiempo en el semen tras pasar la enfermedad, existe un potencial riesgo de transmisión (6). Se estima que el riesgo de que el ARN viral persista en este fluido corporal es prácticamente nulo después de 24 meses, aunque se sabe de la existencia de un paciente de Liberia que continuó dando positivo 40 meses después (23).

En este caso, se propondría determinar el ARN viral en el semen de varones adultos de entre 18-65 años (n=40) con diagnóstico confirmado por q-PCR para la realización de un ensayo clínico doble ciego, randomizado y con grupo control con placebo, y se les administraría respectivamente, 400mg de fármaco o placebo al día por vía oral durante 28 días. Se lleva a cabo la monitorización de los pacientes mediante la extracción de muestras de sangre y entrevistas, para conocer posibles efectos secundarios y/o resistencias, y se llevaría a cabo una medición semanal de ARN viral durante un periodo de 13 meses, comparando la carga viral entre ambos grupos al final de ese periodo (22).

Los datos clínicos que se disponen del fármaco sobre su actividad frente a VHC sugieren que el perfil farmacocinético es bueno, por lo que podría usarse en el tratamiento del Ébola. Además, al tener un gran volumen de distribución, aumenta la probabilidad de que alcance la concentración suficiente en los reservorios del virus (por ejemplo, en los ojos). Si el uso de Sofosbuvir reduce significativamente la mortalidad asociada al Ébola, se deberían llevar a cabo estudios para evaluar su eficacia como medida profiláctica, como medida post-exposición y en aquellas personas que hayan superado la enfermedad (22).

3.2. SURAMINA

Características principales

La Suramina está incluida en la lista de medicamentos esenciales que elabora la OMS, es el tratamiento de primera elección en las fases hemáticas y linfáticas del ciclo de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agente etiológico de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana (24). Es el tratamiento de segunda línea para *T. brucei gambiense* tras la pentamidina. Su administración es parenteral y entre sus efectos secundarios destacan la fatiga, desarrollo de neuropatías, problemas renales, náusea, alteraciones hematológicas, reacciones cutáneas y shock anafiláctico.

Se recomienda su uso en mujeres embarazadas al considerarse que el beneficio que se obtiene es superior al riesgo que supone. Ya no se usa en el tratamiento de *Onchocerca volvulus* debido a que la muerte de los parásitos provoca una reacción inflamatoria tóxica, pero para el tratamiento de otras enfermedades parasitarias el perfil del fármaco es generalmente seguro.

Estructura y mecanismo de acción

En cuanto a su mecanismo de acción se cree que actúa inhibiendo enzimas glucolíticas, en particular hexoquinasa, aldolasa, fosfoglicerato quinasa y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, que participan en el metabolismo de *T. brucei* (25).

La Suramina se ha visto que tiene actividad antiviral frente al virus Chikungunya, los ensayos in vitro realizados para comprobar la relación entre la estructura y la actividad revelaron que su estructura simétrica, así como los 6 grupos de ácido sulfónico que presenta (Figura 7) son imprescindibles contra el virus Chikungunya (26).

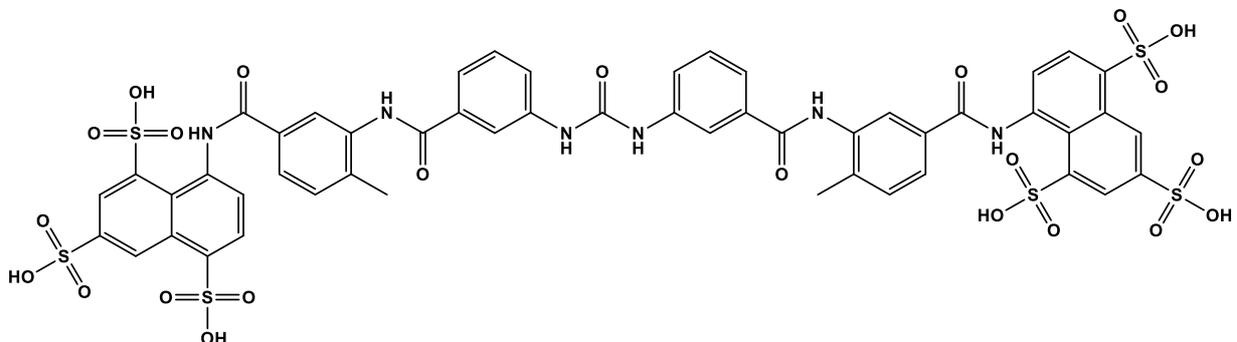


Figura 7: Estructura de la Suramina.

Sin embargo, debido a su naturaleza polianiónica, su permeabilidad de membrana es baja, lo que limita su uso terapéutico, aunque puede llevarse a cabo su encapsulación en un sistema

liposomal consiguiendo así que se absorba por las células. Además, al ser una molécula cargada tampoco atraviesa la barrera hematoencefálica. La larga vida media del fármaco, de entre 36-60 días, puede suponer una ventaja a la hora de aumentar la eficacia en su uso contra el Zika y el Ébola.

La inhibición por este fármaco es dosis-dependiente. La Suramina puede inhibir significativamente distintas cepas del virus a concentraciones no citotóxicas. Además, no se han encontrado cepas del virus Zika resistentes al fármaco (27).

Ensayos en el Zika

Ensayos *in vitro* en células Vero (células epiteliales extraídas de mono verde africano) frente al Zika postulan que inhibe los procesos de entrada y replicación del virus, siendo efectivo inhibiendo la infección si se administra entre 1-24 horas post-infección (27).

Ensayos *in silico* revelaron que sólo el extremo aniónico de la suramina (SO₃⁻) interacciona con los residuos cargados positivamente de la proteína de la envoltura. Se hipotetiza que estas interacciones podrían afectar negativamente a la capacidad del virus de acoplarse a las células del huésped (27).

También se ha propuesto que la Suramina podría interactuar con los receptores AXL y TIM-1 interfiriendo así con la entrada del virus (28). El receptor TIM-1 se encuentra altamente expresado la placenta y en la interfaz entre ésta y el útero, mientras que el receptor AXL se expresa sobre todo en los astrocitos y en la microglía del cerebro en desarrollo, y media la infección por el virus Zika de células de la glía. El virus requiere el ligando Gas6 del receptor para poder entrar a la célula empleando este receptor. Cuando la entrada del virus se realiza por esta vía, se forma un complejo Gas6-Zika que activa la actividad quinasa del receptor AXL de forma que provoca la disminución de la señalización por interferones y facilita la infección del virus (29).

Además, la suramina interfiere con la replicación del virus actuando sobre la helicasa NS3, bloqueando la separación de las hebras de ARN. Ensayos *in silico* con Suramina sugieren que el fármaco se sitúa en el sitio cargado positivamente al que se une el ARN en la helicasa NS3, aunque también existe la posibilidad que se pueda unir al sitio de unión del ATP en la misma enzima. El fármaco establece muchas interacciones con los residuos de la enzima, lo cual permite mantenerse firmemente unido (27).

La dinámica molecular reveló que es más fuerte la interacción del fármaco con la helicasa NS3 que la que establece con la proteína de la envoltura.

La figura 8 se recoge un esquema sobre los lugares de actuación del fármaco que se han descrito anteriormente en el texto.

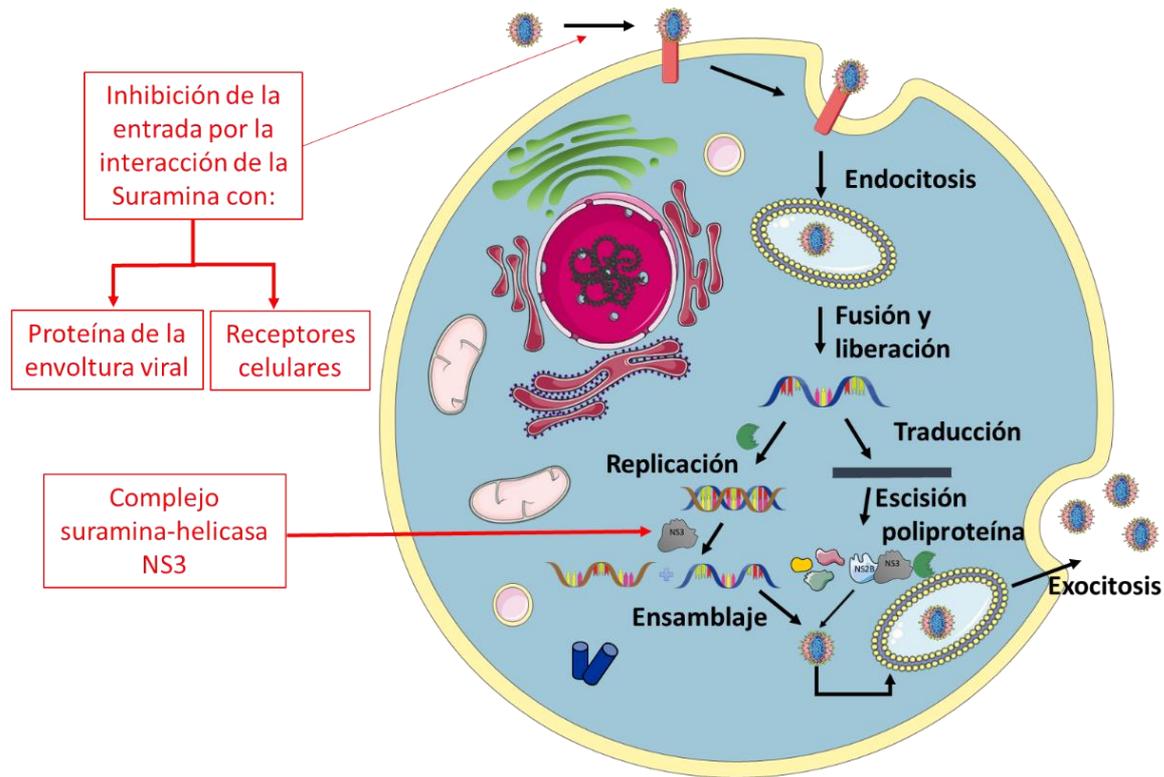


Figura 8: Esquema del ciclo del Zika y de las dianas de la Suramina.

Ensayos en el Ébola

Este fármaco también se ha estudiado como posible tratamiento para el Ébola. Los primeros estadios de la infección tienen lugar gracias a las glicoproteínas virales (proteínas GP) que median el acoplamiento y la entrada del virus al interior celular. Para ello necesitan interactuar con diversas moléculas, como los proteoglicanos ampliamente distribuidos en las superficies de las células y que presentan una proteína transmembrana unida a glicosaminoglicanos (GAGs). Como se observa en la figura 9, la interacción entre los GAGs y la glicoproteína viral deriva en la macropinocitosis del virus, produciéndose, a continuación, la escisión proteolítica sobre GP1 y GP2 mediada por las catepsinas dependientes de pH ácido, permitiendo la unión de la proteína viral al receptor de Niemann Pick C1 (NPC1), lo cual desembocará en la liberación del virus al citoplasma celular (8).

La Suramina es un inhibidor competitivo de los glicosaminoglicanos, que actúa impidiendo que el virus pueda interactuar con los GAGs, inhibiendo la entrada a las células del virus (Figura 9) (30).

Se han realizado ensayos *in vitro*, mediante el empleo de un vector lentiviral al que se le incorpora la proteína GP viral heteróloga. Esto permite realizar estudios sin usar el virus nativo evitando mantener el nivel de bioseguridad de nivel 4 (BSL-4) que requiere el Ébola, siendo suficiente con un nivel 2. El vector se añadió a células embrionarias de riñón humano de la línea 293T y se vio que el fármaco inhibía la entrada mediada por la glicoproteína viral. Posteriormente se realizaron ensayos en células Huh7 confirmándose que tenía lugar la inhibición del virus (30).

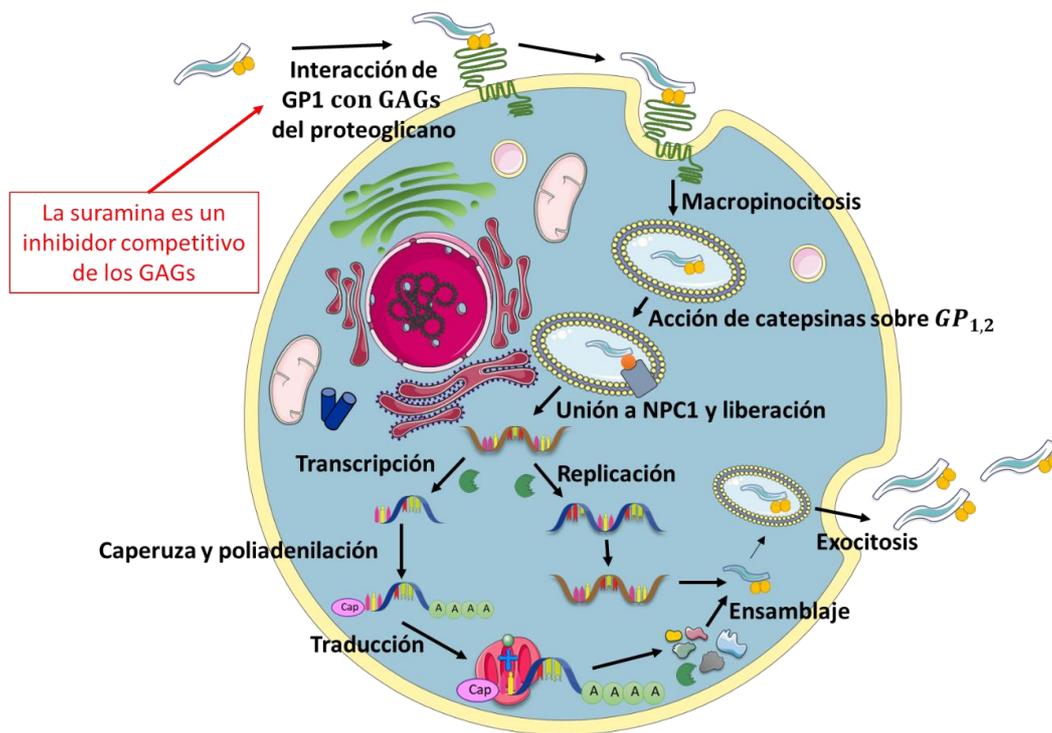


Figura 9: Esquema del ciclo del Ébola y diana de la Suramina.

A pesar de los efectos secundarios que presenta el fármaco, debido a la alta letalidad del Ébola y a los problemas asociados al Zika y que en ambos casos no existe tratamiento, pueden suponer que el balance del beneficio sobre el riesgo sea aceptable, aunque se requieran, en primer lugar, estudios *in vivo*.

3.3. NOVOBIOCINA

Características principales

La Novobiocina es un fármaco candidato al reposicionamiento con posible uso en embarazadas y en pacientes con complicaciones severas asociadas al Zika. Se utiliza como diagnóstico para diferenciar la especie de *Staphylococcus* ya que *S. epidermidis*, a diferencia de *S. saprophyticus*, es susceptible a la Novobiocina.

Mecanismo de acción

Este antibiótico aminocumarínico ejerce su efecto principalmente frente a bacterias del género *Staphylococcus*, inhibiendo competitivamente la reacción catalizada por la subunidad GyrB de la ADN girasa.

Ensayos en el Zika

Estudios de docking (acoplamiento molecular) para predecir las interacciones entre el fármaco con la diana y estudios de dinámica molecular sugieren que la Novobiocina es capaz de unirse a la proteasa de serina NS2B-NS3 del virus Zika con alta estabilidad. La función de esta proteasa (Figura 10) es escindir la poliproteína obtenida como producto de la traducción, para dar lugar a las proteínas virales estructurales y no estructurales durante la replicación del

virus. La figura 11 muestra la formación de tres enlaces de hidrógeno entre el fármaco y la enzima, con áreas de estabilización por interacciones hidrofóbicas (31).

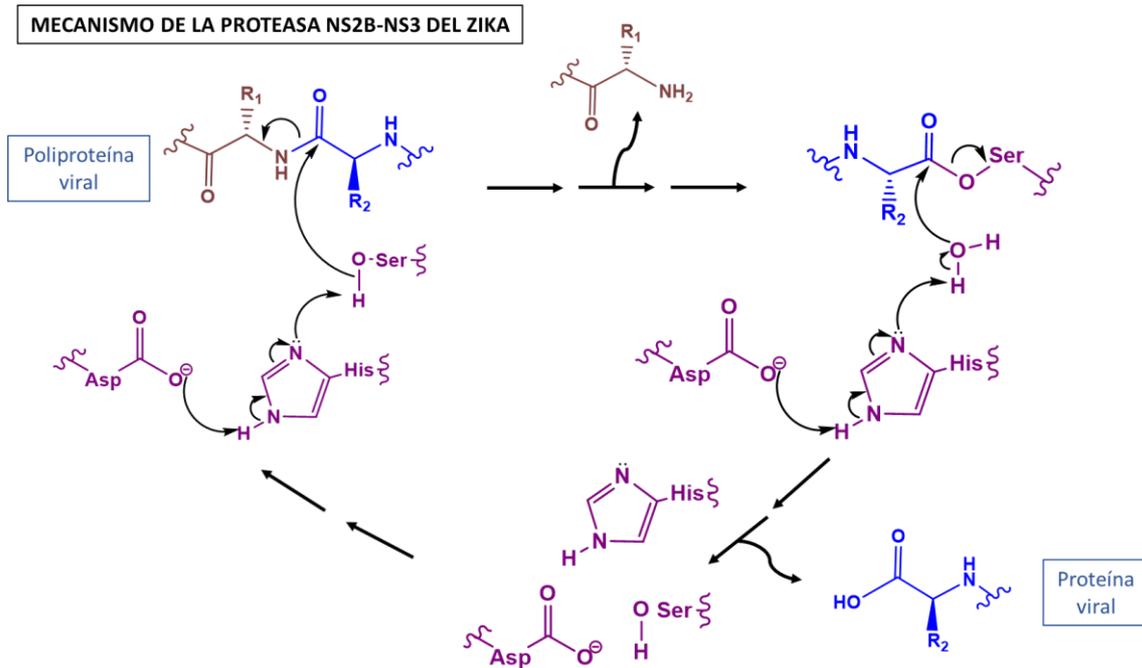


Figura 10: Mecanismo de acción de la proteasa NS2B-NS3 del virus Zika para la obtención de las proteínas virales a partir de la poliproteína viral.

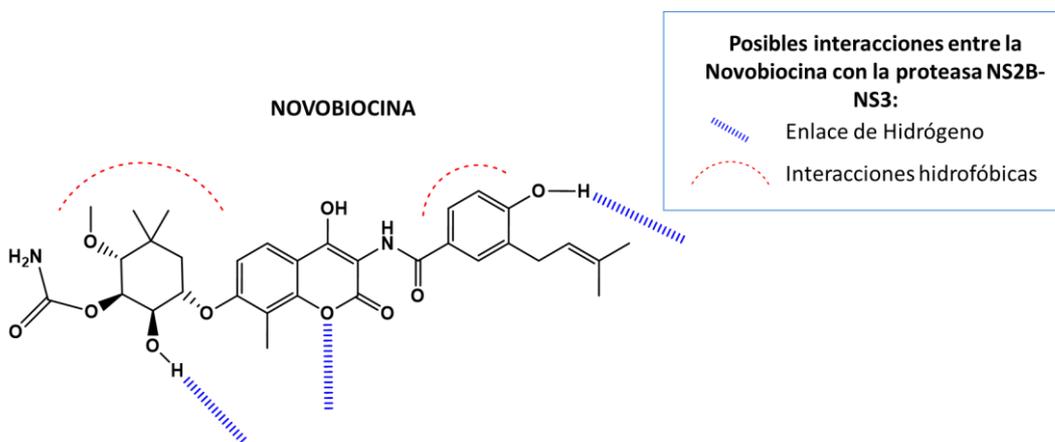


Figura 11: Interacciones que establece el fármaco con la proteasa NS2B-NS3 del virus Zika.

El fármaco es potencialmente susceptible de emplearse en diferentes cepas del virus. Ensayos *in vitro* en células Vero mostraron una disminución de la carga viral, observándose una inhibición dosis-dependiente y una actuación del fármaco en un estadio post-entrada, lo que apoyaría la hipótesis de que inhibe la proteasa viral (31).

Ensayos *in vivo* en ratones inmunodeprimidos con dexametasona que presentaban una infección general con el Zika, demostraron que las posibilidades de sobrevivir del grupo tratado con Novobiocina administrada subcutáneamente eran muy superiores a las del grupo control (100% vs. 0%). Además, el grupo tratado mostró menor carga viral tanto en sangre como en tejidos y órganos, siendo los cambios histopatológicos mucho menos severos (32). El grupo control mostró un estado diseminado del virus, una cantidad abundante del antígeno

viral NS1 y una deterioración clínica con inflamación multiorgánica, mientras que los ratones tratados tenían una cantidad mínima de expresión del mismo antígeno sin apenas infiltrado inflamatorio. Aunque la penetración del fármaco en el sistema nervioso central (SNC) a través de las meninges no inflamadas puede estar limitada, el control temprano de la viremia y de la posible penetración del fármaco a través de las meninges inflamadas probablemente contribuyó a mejorar el resultado de los ratones que recibieron el tratamiento.

En 2011 EEUU retiró la venta de la Novobiocina al surgir nuevos antibióticos que presentaban una mayor efectividad frente a *Staphylococcus*. Aun así, el tratamiento con Novobiocina se tolera bien clínicamente y al pertenecer a la categoría C de la FDA puede ser utilizado en embarazadas en determinadas circunstancias, aun así su seguridad y eficacia para esta posible nueva indicación deberían evaluarse más extensamente mediante ensayos en modelos experimentales y humanos (33).

CONCLUSIÓN

El empleo de fármacos como el Sofosbuvir, Suramina y Novobiocina representa una alternativa interesante en el tratamiento de las enfermedades causadas por virus como el Ébola o el Zika. Sin embargo, hoy en día existen muchas otras enfermedades que ponen el riesgo la vida para las cuales no existe tratamiento. La importancia de la investigación en la búsqueda de antivirales, no solo en el desarrollo de nuevas moléculas, sino también en el estudio de diferentes aplicaciones de fármacos ya existentes para el tratamiento de otras patologías, permitiría agilizar este proceso de búsqueda. El reposicionamiento constituye, por tanto, una alternativa terapéutica de gran interés para el tratamiento de enfermedades virales, al proporcionar una biblioteca de posibles fármacos candidatos de manera más rápida, evitando de este modo problemas de expansión y propagación, de interés global y que tanto afectan a la salud, como el ejemplo actual del SARS-CoV-2, con sus problemas de control y abastecimiento hospitalario y de material sanitario.

BIBLIOGRAFÍA

1. García-Serradilla M, Risco C, Pacheco B. Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals. *Virus Res* [Internet]. 2019;264(February):22-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.02.011>
2. WHO. Blueprint for R & D preparedness and response to public health emergencies due to highly infectious pathogens WORKSHOP ON PRIORITIZATION OF PATHOGENS Executive summary The R & D Blueprint Prioritization workshop Prioritization elements. *Work prioritisation Pathog* [Internet]. 2015;(December):1-7. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/>
3. Park SE. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clin Exp Pediatr*. 2020;63(4):119-24.
4. Bekerman E, Einav S. Combating emerging viral threats. *Science* (80-). 2015;348(6232):282-3.
5. Malvy D, McElroy AK, de Clerck H, Günther S, van Griensven J. Ebola virus disease. *Lancet*. 2019;393(10174):936-48.

6. Rojas M, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramírez-Santana C, Ansari AA, et al. Ebola virus disease: An emerging and re-emerging viral threat. *J Autoimmun* [Internet]. 2020;106(November 2019):102375. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102375>
7. Rivera A, Messaoudi I. Molecular mechanisms of Ebola pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):889-904.
8. Hume AJ, Mühlberger E. Distinct Genome Replication and Transcription Strategies within the Growing Filovirus Family. *J Mol Biol* [Internet]. 2019;431(21):4290-320. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.029>
9. Broadhurst MJ, Brooks TJG, Pollock NR. Diagnosis of ebola virus disease: Past, present, and future. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(4):773-93.
10. Griensven J Van, Edwards T, Lamballerie X De, Semple MG, Gallian P, Baize S. Europe PMC Funders Group Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. 2018;374(1):33-42.
11. Vacuna contra el virus Ébola Zaire [rVSVΔG - ZEBOV- GP, vivo]. 2019;31(0).
12. Kazmi SS, Ali W, Bibi N, Nouroz F. A review on Zika virus outbreak , epidemiology , transmission and infection dynamics. *J Biol Res* [Internet]. 2020;1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40709-020-00115-4>
13. Gorshkov K, Shiryayev SA, Fertel S, Lin YW, Huang CT, Pinto A, et al. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. *Front Microbiol*. 2019;10(JAN):1-17.
14. Leung C. A lesson learnt from the emergence of Zika virus: What flaviviruses can trigger Guillain-Barré syndrome? *J Med Virol* [Internet]. :0-2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25717>
15. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880-96.
16. Abrams RPM, Solis J, Nath A. Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System. *Neurotherapeutics*. 2017;14(4):1027-48.
17. Centers for Disease Control and Prevention. Prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real. 2017; Disponible en: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/trioplex-real-time-rt-pcr-assay-instructions-for-use-sp.pdf>
18. Zuharah WF, Fadzly N, Yusof NA, Dieng H, Ni X. Risky behaviors: Effects of toxorhynchites splendens (Diptera: Culicidae) Predator on the Behavior of Three Mosquito Species. *J Insect Sci*. 2015;15(1):1-7.
19. Ferraris P, Yssel H, Missé D. Zika virus infection: an update. *Microbes Infect*. 2019;21(8-9):353-60.
20. Sacramento CQ, De Melo GR, De Freitas CS, Rocha N, Hoelz LVB, Miranda M, et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(December 2016):1-11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40920>

21. Mesci P, Macia A, Moore SM, Shiryayev SA, Pinto A, Huang CT, et al. Blocking Zika virus vertical transmission. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13.
22. Reznik SE, Tiwari AK, Ashby CR. Sofosbuvir: A potential treatment for Ebola. *Front Pharmacol.* 2018;9(OCT):2016-9.
23. Keita AK, Vidal N, Toure A, Kalifa Diallo MS, N'Fally M, Baize S, et al. A 40-month follow-up of Ebola virus disease survivors in Guinea (Postebogui) reveals long-term detection of Ebola viral ribonucleic acid in semen and breast milk. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(12):11-3.
24. WHO. World health organization model list of essential medicines. *Ment Holist Heal Some Int Perspect* [Internet]. 2019;119-34. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>
25. Wiedemar N, Hauser DA, Mäser P. 100 Years of Suramin. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 16 de diciembre de 2019;64(3):1-14. Disponible en: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01168-19>
26. Albuлесcu IC, Van Hoolwerff M, Wolters LA, Bottaro E, Nastruzzi C, Yang SC, et al. Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. *Antiviral Res* [Internet]. 2015;121:39-46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.013>
27. Tan CW, Sam IC, Chong WL, Lee VS, Chan YF. Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res.* 2017;143:186-94.
28. Albuлесcu IC, Kovacikova K, Tas A, Snijder EJ, van Hemert MJ. Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antiviral Res.* 2017;143:230-6.
29. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* 2017;18(2):324-33.
30. Henß L, Beck S, Weidner T, Biedenkopf N, Sliva K, Weber C, et al. Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry. *Virology* [Internet]. 2016;13(1):1-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0607-2>
31. Yuan S, Chan JFW, den-Haan H, Chik KKH, Zhang AJ, Chan CCS, et al. Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2017;145:33-43.
32. Bernatchez JA, Tran LT, Li J, Luan Y, Siqueira-Neto JL, Li R. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *J Med Chem.* 2020;63(2):470-89.
33. Han Y, Mesplède T. Investigational drugs for the treatment of Zika virus infection: a preclinical and clinical update. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2018;27(12):951-62. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1548609>.