



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

Licenciatura en Bioquímica  
Facultad de Ciencias, Sección Virología  
Universidad de la República

Tesina de grado

# BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITIAL Y EL VIRUS INFLUENZA

ESTUDIANTE: Bach. Catalina Barbot

TUTORA: Dra. Sandra Frabasile

CO-TUTOR: Dr. Andrés Pizzorno

Montevideo, Uruguay

**2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

*A Sandra, por tomarme como estudiante y haberme ofrecido ser parte de este proyecto en el marco de una tesina, como también por su gran energía, alegría y disposición para guiarme en todo momento.*

*A Andrés, por ser uno de mis referentes y por haberme dado la posibilidad de realizar la pasantía en Lyon.*

*A todos los miembros del tribunal, por tomarse el tiempo y trabajo de corregir esta tesina.*

*A todos los integrantes del Laboratorio de Virología, por lo que me han enseñado y lo que hemos compartido en el día a día.*

*A mis compañeros de la sala de cultivos, por la buena onda, el apoyo y por hacer más divertidas las horas de trabajo.*

*A todos mis amigos y particularmente a aquellos que conocí en Facultad y con quienes tuve el gusto de compartir esta travesía, ya que nada de esto hubiera sido lo mismo sin ellos.*

*A mi familia, por estar siempre presente y motivarme para que fuera encontrando mi camino.*

*Y por último, a todos los docentes, investigadores, amigos y compañeros de laboratorio que me transmitieron sus conocimientos, y por que por su forma de hacerlo me hicieron enamorarme de la ciencia, del saber y alimentaron mis ganas de superarme y crecer como científica.*

# ÍNDICE

---

<b>1. RESUMEN</b> .....	4
<b>2. ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>3.1 Infecciones agudas del tracto respiratorio</b> .....	6
<b>3.2 Virus respiratorio sincitial</b> .....	7
3.2.1 Epidemiología e importancia clínica .....	7
3.2.2 Características generales .....	8
3.2.3 Ciclo replicativo .....	10
3.2.4 Prevención y tratamiento .....	12
3.2.4.1 Antecedentes del combate contra VRS .....	12
3.2.4.2 Vacunas en desarrollo .....	13
3.2.4.3 Tratamientos aprobados por la FDA contra VRS .....	14
3.2.4.3.1 Ribavirina .....	14
3.2.4.3.2 Palivizumab .....	15
3.2.4.4 Antivirales en desarrollo .....	15
<b>3.3 Virus Influenza</b> .....	17
3.3.1 Epidemiología e importancia clínica .....	17
3.3.2 Características generales .....	17
3.3.3 Ciclo replicativo .....	20
3.3.4 Prevención y Tratamiento .....	22
3.3.4.1 Vacunas aprobadas contra Influenza .....	22
3.3.4.2 Vacunas en desarrollo .....	23
3.3.4.3 Antivirales aprobados por la FDA contra influenza .....	24
3.3.4.3.1 Antivirales contra M2 .....	24
3.3.4.3.2 Antivirales contra NA .....	24
3.3.4.3.3 Antiviral contra PA .....	25
3.3.4.4 Antivirales en desarrollo .....	26
<b>3.4 Antecedentes del estudio</b> .....	27
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	29
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	29
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
<b>5.1 Moléculas</b> .....	30
<b>5.2 Células</b> .....	31
<b>5.3 Virus</b> .....	31

5.3.1 VRS-mcherry .....	32
5.3.2 VRS-GFP .....	32
5.3.3 Inf-nLuc .....	32
<b>5.4 Titulación de las cepas de VRS en células HEp-2 .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y G2 en células HEp-2 .....</b>	<b>34</b>
<b>5.6 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra VRS en células HEp-2 .....</b>	<b>35</b>
5.6.1 Ensayo de fluorescencia con el virus reportero VRS-mcherry .....	35
5.6.2 RT-qPCR de infección con VRS-GFP .....	36
<b>5.7 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza en células A549 .....</b>	<b>36</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6.1 Titulación de las cepas de VRS en células HEp-2 .....</b>	<b>37</b>
<b>6.2 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y G2 en células HEp-2 .....</b>	<b>38</b>
<b>6.3 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra VRS en células HEp-2 .....</b>	<b>42</b>
6.3.1 Ensayo de fluorescencia con el virus reportero VRS-mcherry .....	42
6.3.2 Ensayo de RT-qPCR con el virus reportero VRS-GFP .....	44
<b>6.4 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza en células A549 .....</b>	<b>46</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>61</b>
<b>9.1 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y del Oseltamivir en células A549 .....</b>	<b>61</b>
<b>9.2 Ensayos preliminares de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza .....</b>	<b>62</b>

## 1. RESUMEN

---

Las infecciones de las vías respiratorias son las enfermedades agudas más frecuentes a nivel mundial, siendo el virus influenza y el virus respiratorio sincitial (VRS) dos de los agentes de mayor impacto, siendo causantes de la mayoría de infecciones de las vías respiratorias altas y bajas respectivamente. Este hecho, sumado a que existe un bajo repertorio de vacunas y antivirales para tratar este tipo de infecciones, los convierte en dos grandes objetivos de investigación, ya que resulta imprescindible la generación de otras estrategias de prevención y tratamiento. Dentro de los enfoques utilizados para la generación de antivirales, se puede destacar la realización de *screenings* de compuestos con estructuras químicas de potencial antiviral y la posterior reedición de dichos compuestos para mejorar la eficiencia y estabilidad de los mismos. En este marco, en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad y actividad antiviral de cinco moléculas llamadas 1167, 1175, 1180, 1188 y 1199. Estas moléculas fueron seleccionadas a partir de un *screening* preliminar realizado contra el virus influenza y fueron testeadas en este trabajo contra VRS y re-analizadas contra el virus influenza. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad en células HEp-2, los cuales permitieron calcular la concentración citotóxica 50% (CC50%) y la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de cada compuesto. Los ensayos de actividad antiviral contra VRS fueron realizados utilizando los virus reporteros VRS-mcherry y VRS-GFP, los cuales permitieron cuantificar los niveles de infección de los cultivos a través de la detección de fluorescencia y realización de RT-qPCRs respectivamente. Para los ensayos de actividad antiviral contra influenza se utilizó el virus reportero Inf-nLuc, el cual permitió hacer medidas de luminiscencia y evaluar la actividad antiviral de las moléculas. Todos estos ensayos permitieron estimar la concentración efectiva 50% (EC50%) de cada molécula contra los virus testeados. Las 5 moléculas analizadas presentaron actividad antiviral contra el virus influenza y 2 de ellas presentaron resultados promisorios en cuanto a su actividad antiviral contra VRS. Este hecho, acompañado de la baja citotoxicidad que mostraron dichas moléculas, las hace atractivas candidatas para la generación de antivirales contra estos virus respiratorios. En este trabajo se evaluó también la citotoxicidad de otros 65 compuestos, se propagaron y titularon 4 cepas de VRS obtenidas a partir de aislamientos naturales (previamente caracterizadas genética y antigénicamente), con el fin de iniciar una nueva ronda de selección a partir de la cual poder generar también antivirales para combatir a los virus mencionados y a otros virus respiratorios.

## 2. ABREVIATURAS

---

**ADN-** Ácido desoxiribonucleico

**ARN-** Ácido ribonucleico

**ARNm-** Ácido ribonucleico mensajero

**CC50%-** Concentración citotóxica 50%

**DICC50%-** Dosis infectantes de cultivo de células 50%

**dsRNA-** *Double stranded ribonucleic acid* (ARN de doble hebra)

**EC50%-** Concentración efectiva 50%

**EPOC-** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**FDA-** *Food and Drug Administration*

**FI-RVS-** *Formalin inactivated respiratory syncytial virus*

**GSK-** GlaxoSmithKline

**IIVs-** *Inactivated Influenza Vaccines*

**INF-** Interferón

**LAIVs-** *Live Attenuated Influenza Vaccines*

**MCNC-** Máxima concentración no citotóxica

**MDV-** *Master donor virus*

**MOI-** *Multiplicity of infection*

**MV-** *Measles virus* (virus del Sarampión)

**OMS-** Organización Mundial de la Salud

**VLP-** *Viral like particles*

**vRNPs-** Ribonucleoproteínas virales

**VRS-** Virus respiratorio sincitial

### 3. INTRODUCCIÓN

---

#### 3.1 Infecciones agudas del tracto respiratorio

Las infecciones agudas del tracto respiratorio son enfermedades generadas principalmente por la invasión y multiplicación de virus o bacterias sobre tejidos pertenecientes a cualquier parte de las vías respiratorias. Los patógenos pueden ingresar al organismo hospedador a través de las fosas nasales o la boca y afectar desde el sitio de entrada hasta tejidos más internos, como lo son el tejido alveolar y pulmonar (Reyes *et al.* 2015). Las infecciones de las vías respiratorias son las enfermedades agudas más frecuentes a nivel mundial, siendo los grupos más susceptibles los niños menores a 5 años y los adultos mayores a 65. En la subpoblación infantil mencionada se encuentra el mayor riesgo de infección e índice de mortalidad, constituyendo así una de las principales causas de muerte para este grupo etario (Moesker *et al.* 2016).

Dependiendo de la zona del tracto respiratorio que se vea afectada, son clasificadas como infecciones respiratorias altas o bajas. Las infecciones respiratorias altas son aquellas que afectan la nasofaringe, orofaringe, laringe, tráquea, oído y senos paranasales, mientras que las infecciones respiratorias bajas afectan la zona pulmonar. Algunas de las enfermedades causadas por este tipo de infecciones son la gripe, bronquitis, bronquiolitis, laringitis y neumonías. Cada una de ellas es generada por determinado grupo de patógenos y da lugar a un cuadro clínico particular que en la gran mayoría de los casos se resuelve en un periodo menor a 15 días. La sintomatología es amplia, destacándose comúnmente: malestar general, tos, fiebre, diferentes grados de dificultad respiratoria, secreción nasal, otorrea, ruidos respiratorios (sibilancias o estertores) y tiraje (Macedo *et al.* 2005).

En cuanto a la etiología, la mayoría de los agentes causales de infecciones respiratorias agudas son virus, especialmente rinovirus (35%), influenza A y B (30%), parainfluenza (12%), virus respiratorio sincitial (VRS, 11%) y adenovirus (8%) (Reyes *et al.* 2015). Dentro de estos, influenza y el virus respiratorio sincitial son considerados como los agentes de mayor impacto, siendo causantes de la mayoría de las infecciones de las vías respiratorias altas y bajas respectivamente (Collins *et al.* 2013).

Las infecciones agudas del tracto respiratorio generan un gran impacto en la sociedad. Por un lado, debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a estas, son muchas las visitas médicas y hospitalizaciones que generan, lo cual representa una enorme carga para los sistemas de salud. Además, dan lugar a un alto índice de absentismo laboral y escolar, generando pérdidas a nivel económico y educacional. A modo de ejemplo, solamente en Estados Unidos, este tipo de infecciones genera 20 millones de días de absentismo laboral y 22 millones de días de absentismo escolar, así como 31,4 millones de visitas médicas, más de 200,000 hospitalizaciones y alrededor de 35.000 muertes, con más de 10,4 billones de dólares en gastos médicos (Moliari *et al.* 2007). En conjunto estos factores ponen en evidencia la gran importancia que tiene el estudio de los patógenos implicados en las infecciones respiratorias agudas, ya que es a través de la generación de conocimiento y el desarrollo de nuevas herramientas que se puede mejorar su prevención y tratamiento.

## 3.2 Virus respiratorio sincitial

### 3.2.1 Epidemiología e importancia clínica

Como sucede con otros virus respiratorios, las infecciones generadas por el virus respiratorio sincitial tienen un carácter estacional. De esta forma, en los países de clima templado las infecciones tienden a hacerse más frecuentes en el período de invierno, cuando las temperaturas son bajas y comienza la época de lluvias. Por otro lado, en los países tropicales los picos de infección se dan durante los días calurosos, húmedos y lluviosos de la temporada de verano (Taleb *et al.* 2018).

Se estima que VRS causa aproximadamente 33 millones de episodios anuales en niños menores a 5 años, con 3 millones de hospitalizaciones y 60 mil muertes (Weinberg *et al.* 2017). La infección por VRS es una de las principales causas de bronquiolitis y bronconeumonías de origen viral, representando así entre un 60% y 80% de las hospitalizaciones por bronquiolitis en Estados Unidos, especialmente en niños menores de 1 año (Kesson *et al.* 2018). En conjunto, estos índices generan una importante carga médica y financiera en los servicios de salud y familias en todo el mundo, generando solo en Estados Unidos un costo anual mayor a los 543 millones de dólares (Pelletier *et al.* 2006).

Casi todos los niños son infectados por VRS en sus primeros 3 años de vida (Taleb *et al.* 2018). Dentro de esta población infantil hay grupos más susceptibles a desarrollar enfermedades severas, como lo son los niños prematuros y aquellos con enfermedades broncopulmonares o cardiopatías congénitas. La evidencia sugiere que una serie de otras afecciones médicas subyacentes también están asociadas con un mayor riesgo de infección grave por VRS, incluido el síndrome de Down, la fibrosis quística, el cáncer, y la inmunodepresión (Simões *et al.* 2018). A pesar de que dichos factores hacen más probable la necesidad de hospitalización, el 70% de las infecciones severas se da en niños previamente considerados “sanos” (Walsh *et al.* 2017). Por otro lado, las infecciones debidas a VRS son también una causa importante de morbilidad y mortalidad en los adultos mayores a 65 años y adultos con enfermedades cardiovasculares o inmunodeprimidos, causando solamente en Estados Unidos unas 10.000 muertes anuales (Simões *et al.* 2015).

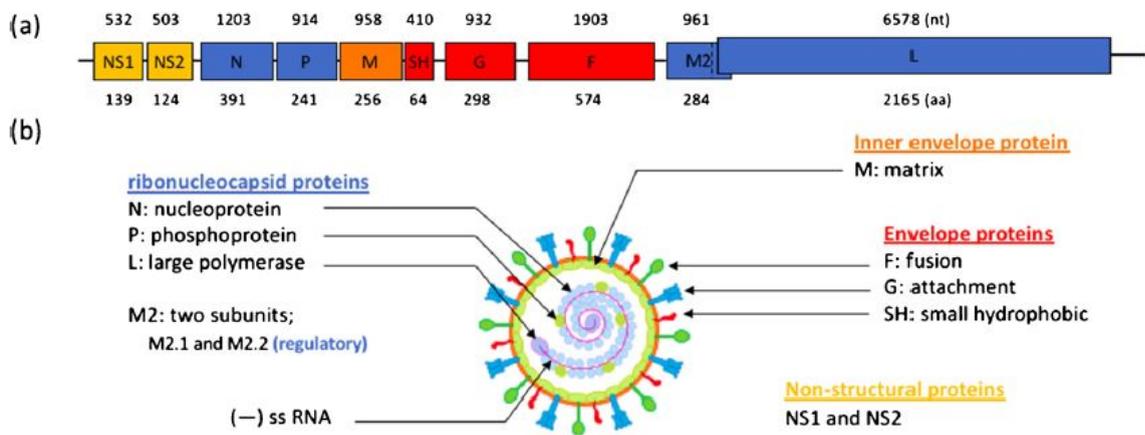
La infección por VRS se manifiesta por obstrucción de las vías respiratorias, secreción nasal, dificultad para respirar, sibilancias, hipoxia, y en casos graves, neumonía y bronquiolitis. Además de eso, el desarrollo del asma ha sido altamente asociado con la infección por VRS en etapas tempranas de la vida (Taleb *et al.* 2018). De hecho, las infecciones graves por VRS no solo presentan un riesgo para la vida de los individuos afectados, sino que también pueden dejar secuelas. Varios estudios han demostrado que la infección por este virus en los primeros años de vida está asociada con problemas respiratorios a largo plazo, incluyendo sibilancias recurrentes, asma y posiblemente sensibilización alérgica, la cual puede persistir en la edad adulta temprana (Simões *et al.* 2018). Además, se ha observado una relación entre los eventos de hospitalización por VRS en niños y el posterior desarrollo de alteraciones en el sistema nervioso central, como también la aparición de convulsiones, apnea central y encefalopatías (Morichi *et al.* 2011; Eisenhut 2007). En conjunto, todos estos factores hacen de VRS uno de los agentes virales de mayor impacto en lo que respecta a infecciones respiratorias.

### 3.2.2 Características generales

El VRS fue aislado por primera vez en 1956 a partir de una muestra de un chimpancé de laboratorio que presentaba una infección alta del tracto respiratorio. Rápidamente se identificó como un virus de origen humano y se lo llamó virus respiratorio sincitial debido a su capacidad para formar sincitios (células gigantes multinucleadas que se forman mediante la fusión de varias células contiguas) en cultivos de células. Diversos estudios epidemiológicos establecieron a este virus como uno de los agentes virales predominantes en las enfermedades severas del tracto respiratorio en la población pediátrica, estando también asociado frecuentemente a infecciones respiratorias en adultos (Hall 2001). Existen versiones animales de VRS incluyendo el VRS bovino (BVRS por sus siglas en inglés “bovine respiratory syncytial virus”) y el virus de la neumonía de ratones (PVM por sus siglas en inglés “pneumonia virus of mice”), sugiriendo que ocurrieron saltos interespecie durante la evolución de este virus. Sin embargo, no existen reservorios animales conocidos del VRS humano (Collins *et al.* 2008).

El VRS pertenece a la familia Pneumoviridae, dentro del orden Mononegavirales. Es un virus pleomórfico y envuelto con una nucleocápside helicoidal. Esta última contiene al genoma viral, el cual está compuesto por una única molécula de ARN simple cadena no segmentada y de polaridad negativa (Collins *et al.* 2013).

El genoma del VRS tiene una longitud de 15.200 nucleótidos y presenta 10 genes, los cuales codifican 11 proteínas, 9 de las cuales son proteínas estructurales (Figura 1a). El virión tiene tres glicoproteínas en la superficie de su bicapa lipídica: la proteína de adhesión G, la cual interactúa con receptores celulares de heparán sulfato permitiendo la adhesión del virus a la célula a infectar; la proteína de fusión F, la cual determina la entrada del virus a la célula a través de la fusión de sus bicapas lipídicas; y por último, una pequeña proteína hidrofóbica llamada SH, la cual forma canales iónicos en las membranas de las células infectadas, alterando su permeabilidad y modulando la respuesta inmune (Taleb *et al.* 2018; Triantafilou *et al.* 2013). La cápside interna del VRS está constituida por la proteína de matriz M (Figura 1b), mientras que la nucleocápside consta de tres proteínas: la nucleoproteína N, cuya principal función es asociarse al genoma viral de forma de proteger al genoma de la degradación y de disminuir su reconocimiento por parte de los receptores celulares; la proteína L, cuyo nombre deriva de “*large protein*”, por ser la subunidad mayor de la ARN polimerasa ARN dependiente, la cual presenta el dominio catalítico; y por último, la fosfoproteína P, la cual sirve como un importante cofactor de dicha enzima y protege al genoma viral dirigiendo proteína N hacia el ARN viral que no se encuentra encapsidado (Vergara *et al.* 2006). Las otras dos proteínas estructurales que presenta este virus son M2-1 y M2-2, las cuales actúan como factores de transcripción y por lo tanto tienen una función regulatoria (Muniyandi *et al.* 2018). Por último, NS1 y NS2 son proteínas no estructurales que tienen un rol, *a priori*, en la inhibición de la apoptosis de las células infectadas, como también en la liberación de interferón (INF) por parte de estas, facilitando así la replicación viral y promoviendo la infección del hospedero (Bitko *et al.* 2007; Kesson *et al.* 2018). Además de las regiones codificantes, el genoma de VRS también presenta una corta región terminal no codificante (líder y remolque) y regiones intergénicas que separan los genes entre sí.



**Figura 1. Genoma y proteínas de VRS**

a) Esquema de la organización del genoma viral de VRS, en el cual se indica la cantidad de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) de cada gen o proteína viral. b) Esquema del virión con sus 11 proteínas clasificadas en base a su función (Taleb *et al.* 2018).

Las proteínas G y F, son de las más importantes a nivel antigénico, ya que son las proteínas responsables de la adhesión del virus a la célula y de la fusión de sus membranas con la consecuente entrada viral. Además de su función, el hecho de ser proteínas de superficie las convierte en los principales antígenos, es decir, los blancos de los anticuerpos neutralizantes generados por la respuesta inmune humoral para combatir la infección.

La proteína F es una proteína de fusión de clase I compuesta por 574 aminoácidos y con un peso molecular de 70 kDa. Es sintetizada por la maquinaria celular como un precursor llamado F0, el cual es procesado proteolíticamente en dos sitios dando lugar a tres fragmentos (F1, p27 y F2). Al generarse el corte en F0, p27 es liberado, mientras que F1 y F2 se mantienen unidos por un puente disulfuro. Estos dos últimos fragmentos representan la forma activa de la proteína, la cual a su vez se agrupa de a trímeros en la envoltura del virión (Graham *et al.* 2015). Además, la proteína F requiere de un cambio conformacional para poder fusionar la membrana de la célula a infectar con la envoltura del virus, lo cual lleva a dos posibles estados de la proteína, llamados proteína de Pre- o Post-fusión. Dichas conformaciones son antigénicamente diferentes en cuanto a los epítopes y capacidades de inducir la generación de anticuerpos neutralizantes que presentan, siendo la conformación Pre-fusión la que genera una respuesta humoral más fuerte, y por lo tanto la más atractiva para el diseño de anticuerpos terapéuticos y vacunas (McLellan *et al.* 2013).

Por otro lado, la proteína G es una proteína integral de membrana de tipo II, compuesta por 298 aa y con un peso molecular de 90 kDa (Graham *et al.* 2016). Es una proteína altamente glicosilada que es expresada como proteína de membrana (Gm) y también en forma soluble (Gs), llegando a representar esta última hasta un 80% de la proteína G total generada durante los estadios más tempranos de la infección (Hendricks *et al.* 1988). Mientras que Gm está implicada en el proceso de adhesión del virus a la célula, Gs es excretada al medio extracelular en el cual interactúa con los anticuerpos neutralizantes generados por la respuesta inmune humoral, jugando un papel importante en la evasión de VRS contra el sistema inmune (Graham *et al.* 2015; Bukreyev *et al.* 2012). A pesar de que la principal función de Gm no es evadir a la respuesta inmunológica del hospedador, también juega un

rol importante en este proceso. Esto se debe a que el ectodominio (dominio de la proteína transmembrana que queda del lado extracelular) de Gm contiene dos dominios de tipo mucina que varían ampliamente en secuencia entre los aislamientos de VRS y que se encuentran altamente glicosilados, lo cual lleva a que la proteína G sea muy variable antigénicamente y por lo tanto facilita que el virus logre escapar de la memoria inmunológica en forma frecuente (Teng *et al.* 2002).

En base a la antigenicidad, VRS se clasifica en dos subtipos, VRS-A y VRS-B, los cuales pueden co-circular en forma temporal y/o geográfica. La variabilidad antigénica entre los dos grupos está determinada por las diferencias génicas de las glicoproteínas G y F, las cuales presentan un 50% y 90% de homología entre el subtipo A y B respectivamente (Taleb *et al.* 2018). Las infecciones generadas por el subtipo A son más frecuentes que aquellas generadas por el subtipo B y su transmisibilidad parece ser mayor (Vandini *et al.* 2017). La existencia de estos dos grupos y la alternancia en la incidencia de estas infecciones virales, podría jugar un rol importante en la habilidad de VRS de infectar a individuos previamente expuestos, superando las barreras preexistentes de la respuesta inmunológica.

El VRS puede ser clasificado también en base a su genotipo. De esta forma, al día de hoy, los análisis de secuencias nucleotídicas de la proteína G han llevado a la identificación de 11 genotipos para VRS-A (GA1-GA7, NA1, NA2, SAA1 y ON1) y 23 para VRS-B (GB1-GB4, SAB1-SAB4, URU1, URU2, BA1-BA12 y THB). Los distintos genotipos del virus también pueden cocircular y la predominancia entre uno u otro varía en función del tiempo y la ubicación geográfica (Vandini *et al.* 2017).

### **3.2.3 Ciclo replicativo**

El ciclo replicativo de VRS (Figura 2) tiene una duración de entre 10 y 12 horas y comienza con el reconocimiento específico de las proteínas G y F virales con receptores de la célula blanco (Collins *et al.* 2013). Como se dijo anteriormente, la proteína G es el componente viral que contribuye en mayor medida a la adsorción del virus a la célula hospedera. Sin embargo, este proceso no solamente está mediado por la unión de dicha proteína con los glicosaminoglicanos sulfatados presentes en la membrana plasmática, sino que también incluye otras interacciones. Algunas de ellas se dan entre los carbohidratos asociados a la proteína G con distintos componentes celulares, mientras que otras están mediadas por la proteína F, la cual interacciona con algunos receptores celulares como lo son las proteínas ICAM-1, Anexina II y Toll-like receptor (TLR-4) (Haid *et al.* 2016).

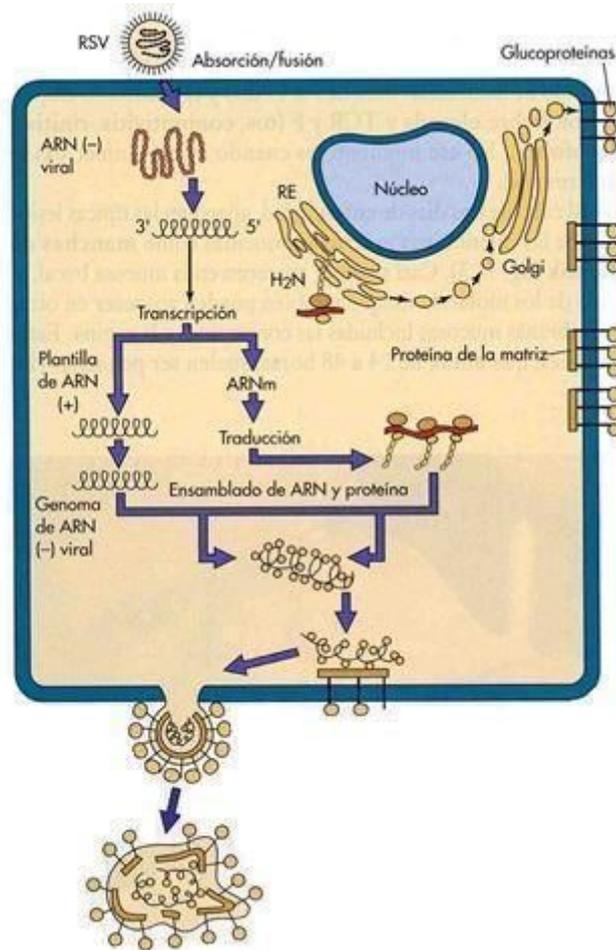


Figura 2. Ciclo replicativo de VRS (Murray *et al.* 2009).

Una vez que el virus se encuentra adherido a la membrana celular, la proteína F media la entrada del virus a la célula a través de la fusión de la envoltura viral y la membrana citoplasmática. El proceso de fusión requiere también de un reconocimiento específico, el cual involucra la interacción entre la proteína F del virus y receptores celulares. Bajo estas condiciones se activa la proteína F y se da en ella un cambio conformacional que permite que su péptido de fusión se inserte dentro de la membrana celular generando un lugar de acceso hacia el citoplasma (Vergara *et al.* 2006). Por el momento no se ha identificado el receptor celular específico que lleva al evento de fusión, sin embargo, en el caso de los Metapneumovirus, los cuales también forman parte de la familia de los *Pneumovirus*, se ha reportado que dicha proteína interactuaría con la integrina  $\alpha\text{V}\beta 1$  (Cseke *et al.* 2009). La fusión de la membrana viral y celular permite entonces la entrada de la nucleocápside, la polimerasa y el resto de las proteínas del virión en el citoplasma celular, lugar en el cual se darán los procesos de transcripción y replicación viral (Collins *et al.* 2013).

La detección de las primeras moléculas de ARNm y de proteínas de VRS ocurre entre las primeras 4 y 6 horas de la infección. La transcripción inicia cuando el complejo de la ARN polimerasa ARN dependiente contacta al promotor localizado en el extremo 3' del genoma. La transcripción de los diferentes genes del VRS ocurre de manera secuencial con la asistencia de la proteína M2-1, que ayuda al complejo polimerasa a pasar a través de las regiones intergénicas. A medida que la transcripción progresa a lo largo del genoma,

algunos complejos se separan y la expresión de los genes que se encuentran distales se reduce, lo cual resulta en un gradiente de expresión desde los genes proximales a los distales (Vergara *et al.* 2006).

Los ARNm sintetizados en el citoplasma van hacia el retículo endoplasmático, en donde son traducidos por la maquinaria celular, y en la red trans-golgi pueden sufrir modificaciones post-traduccionales. Luego, a través del aparato de Golgi las proteínas de superficie del virus son transportadas hacia la membrana celular, en donde son ancladas (González-Reyes *et al.* 2001). A medida que ocurre la transcripción y traducción, los productos proteínicos se acumulan y cuando el factor regulador M2-2 alcanza un cierto nivel, el complejo polimerasa cambia del modo transcripcional al modo de replicación. En este estadio, se sintetiza la copia antígenica con orientación positiva, la cual sirve como plantilla para generar los genomas de la progenie viral (Vergara *et al.* 2006).

La unión de la proteína N al ARN genómico permite el ensamblaje de la nucleocápside, la cual se complementa con la incorporación del resto de las proteínas asociadas a la misma. Estos complejos riboprotéicos se dirigen hacia la membrana plasmática de la célula, en la cual se forman “balsas lipídicas” que contienen proteínas de superficie virales. Allí también se encuentra anclada la proteína de matriz M, con la cual interactúan las proteínas N, mediando así el ensamblaje del virus (Collins *et al.* 2013).

La liberación de los nuevos viriones se da por brotamiento a través de la membrana plasmática, proceso en el cual el virus se lleva parte de la bicapa lipídica celular en la cual están ancladas las proteínas virales mencionadas, emergiendo así como virus envueltos (Bäichi *et al.* 1988). Estos nuevos virus difunden a través del espacio extracelular y eventualmente pueden infectar a las células vecinas. Además, VRS es capaz de generar sincitios, hecho que lo dota de otra forma de propagación viral. Dicha capacidad se debe al hecho de que al producirse la proteína F y anclarse a la membrana de la célula infectada, dicha proteína puede interactuar con receptores de células vecinas y dar lugar a la fusión de ambas células. De esta forma, al unirse los citoplasmas de las células contiguas el virus puede ir expandiendo el área de infección. En conjunto, estas dos formas de difusión viral permiten que VRS se pueda ir propagando de un tejido a otro del aparato respiratorio dando lugar a distintas enfermedades.

### **3.2.4 Prevención y tratamiento**

#### **3.2.4.1 Antecedentes del combate contra VRS**

En la década de 1960, unos pocos años después de que VRS fuera identificado, una preparación de VRS humano inactivado en formalina (FI-RVS del inglés “formalin inactivated respiratory syncytial virus”) fue utilizada en un ensayo clínico como primer intento de vacunación contra el virus. En cuatro estudios independientes, la vacuna FI-RVS fue administrada a niños de entre 2 y 7 meses de edad. Desafortunadamente, esta vacuna no solo falló en proteger a los niños inmunizados cuando eran naturalmente infectados por VRS, sino que provocó una enfermedad pulmonar exacerbada con síntomas más severos que aquellos observados en los niños no vacunados, dando lugar a la hospitalización del 80% de los individuos vacunados y la muerte del 20% (Kim *et al.* 1969). El fracaso de la vacuna fue atribuido a varias características inmunológicas asociadas con la respuesta

humoral y celular. Dentro de ellas, la modificación de epítopes virales por acción de la formalina y el desarrollo de anticuerpos de baja afinidad contra los antígenos de VRS modificados, parecerían haber contribuido a la respuesta inmune perjudicial provocada por esta primera aproximación de vacuna (Gomez *et al.* 2014).

Desde la generación de FI-RSV, se han desarrollado numerosas vacunas candidatas utilizando una amplia gama de estrategias, en un intento de inducir una respuesta inmune segura y eficaz. Sin embargo, hasta el momento esto no ha sido logrado con éxito.

### **3.2.4.2 Vacunas en desarrollo**

La mayoría de las vacunas candidatas contra VRS se encuentran en proceso de desarrollo a nivel de investigación o están cursando ensayos preclínicos. Sin embargo, existen varias vacunas candidatas que se encuentran en ensayos clínicos y la mayoría de ellas presentan un enfoque basado en la proteína F de VRS. Algunas de las razones por las cuales dicha proteína es el blanco más utilizado para el desarrollo de vacunas son: 1) El hecho de que la actividad fusogénica de la proteína F es esencial para que el virus VRS sea infeccioso; 2) La baja variabilidad genética y antigénica de dicha proteína; 3) La alta capacidad que presenta para dar lugar a la generación de anticuerpos neutralizantes; 4) El hecho de tener al Palivizumab como antecedente que demuestra la posible efectividad de los anticuerpos neutralizantes para reducir las enfermedades severas generadas por VRS (Graham *et al.* 2015; McLellan *et al.* 2013).

En este contexto, existen varias vacunas candidatas que están siendo evaluadas para la protección de niños pequeños a través de la inmunización materna o inmunización directa. Entre ellas se puede destacar una vacuna candidata la cual está formulada a base de nanopéptidos de la proteína F y cuya actividad profiláctica se basa (al igual que para todas las vacunas) principalmente en la inducción de una memoria inmunológica que dé lugar a la producción de anticuerpos neutralizantes por parte del hospedero. Dicha preparación está cursando ensayos clínicos de fase III (ClinicalTrials.gov: NCT02624947) para la vacunación de madres cursando su tercer trimestre de embarazo. Mediante esta metodología de inmunización materna lo que se pretende es generar una protección en los niños pequeños vía la adquisición de anticuerpos maternos, ya sea a través de la unión feto-placentaria como a través de la lactancia. Hasta el momento, los resultados preliminares señalan que esta vacuna sería bien tolerada e inmunogénica, generando anticuerpos de tipo IgG que persisten por al menos 91 días en el cuerpo de las mujeres inmunizadas, permitiendo así la transferencia hacia los fetos (Simões *et al.* 2018). Por otro lado, la empresa MedImmune realizó un ensayo de Fase I/IIa (NCT00686075) con el fin de evaluar la seguridad, tolerabilidad, inmunogenicidad y el combate viral de la vacuna candidata MEDI-534 en niños menores a 2 años de edad. Dicha vacuna, de administración intranasal, es una vacuna formulada a base de virus atenuados de VRS y el virus Parainfluenza de tipo 3. Este estudio ya finalizado arrojó un perfil de seguridad aceptable, sin embargo, solo el 50% de los inmunizados resultaron ser seropositivos para VRS luego de la inmunización (Yang *et al.* 2013). Como último ejemplo de vacunas para la inmunización de niños pequeños, la empresa GlaxoSmithKline (GSK) presenta actualmente un ensayo clínico de fase II (NCT02927873) en el cual se está probando una preparación contra VRS en niños seropositivos de entre 12 y 23 meses de edad. Dicha vacuna candidata es de administración intramuscular y está hecha en base a un adenovector derivado de chimpancé, el cual porta proteínas de VRS que funcionan como antígenos y pretenden inducir la generación de

anticuerpos contra el virus.

Para la prevención de infecciones generadas por VRS en adultos, también existen algunas vacunas candidatas cursando ensayos clínicos. GSK tiene una vacuna candidata la cual está codificada por un vector adenoviral derivado de chimpancé, la cual se encuentra en un ensayo de Fase II en mujeres sanas no embarazadas de 18 a 45 años. En dicho estudio no se han visto efectos adversos de la vacuna y se obtuvieron niveles de reactogenicidad similares al de la vacuna utilizada como control (Jiří *et al.* 2018). Otro candidato a vacuna contra VRS basado en vectores adenovirales es el compuesto VXA-RSV-f, el cual expresa la proteína F y un adyuvante de dsRNA. Dicho fármaco fue generado por Vaxart y cursa un estudio de Fase I (NCT02830932) en individuos de 18 a 49 años. Como último ejemplo, también la compañía Janssen Vaccines & Prevention B.V. está llevando a cabo un estudio de fase II (NCT03334695) con el fin de evaluar la eficacia profiláctica de la vacuna Ad26.RSV.preF, la cual también está formulada en base a un adenovector viral pero solo codifica para la proteína F de VRS. Dicha preparación se está probando para la inmunización de adultos sanos de entre 18 y 50 años contra VRS.

Por último y en cuanto a vacunas utilizadas para la inmunización de adultos mayores, hay por ejemplo un estudio de fase III (NCT02608502) llevado a cabo por Novavax para evaluar la eficacia de una vacuna a base de la proteína F de VRS en esta subpoblación susceptible.

### **3.2.4.3 Tratamientos aprobados por la FDA contra VRS**

Actualmente hay solo dos fármacos aprobados por la FDA (“Food and Drug Administration”) para combatir las infecciones generadas por VRS. Dentro de estos la Ribavirina es el antiviral más utilizado, sin embargo su administración varía entre los distintos centros médicos y su efectividad no está totalmente comprobada (Ventre *et al.* 2007). Por otro lado, existe la opción de una inmunización pasiva preventiva o post-exposición con el anticuerpo monoclonal Palivizumab (Synagis®). A pesar de ello, este tratamiento presenta algunas características (ver detalle más abajo) que llevan a que su utilización se vea restringida a ciertos casos puntuales y de alto riesgo (Resch *et al.* 2017).

#### **3.2.4.3.1 Ribavirina**

La Ribavirina es uno de los dos únicos tratamientos contra VRS aprobados por la FDA. Dicho fármaco es un nucleótido sintético análogo de inosina, que presenta actividad antiviral contra varios virus incluyendo a VRS (<https://www.fda.gov/regulatory-information>). Su modo de acción se basa principalmente en la inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa celular (IMPDH), enzima que cataliza la conversión de la inosina 5´monofosfato (IMP) en xantinasina 5´monofosfato (XMP). Dicho proceso es un paso limitante en la síntesis de nucleótidos de guanina, por lo cual la inhibición de esta enzima causa una reducción general de la cantidad de este nucleótido disponible en la célula. Además, como el GTP es un cofactor que participa en la conversión de IMP en adenosina 5´monofosfato (AMP), el *pool* de adenosina también se ve reducido. En conjunto, la disminución de estos dos nucleótidos interrumpe la síntesis de ADN y ARN en forma indiscriminada. También se ha sugerido que, para los virus con genoma de ARN, la Ribavirina podría llevar a cabo su efecto antiviral mediante la inducción de mutaciones en el genoma viral, al ser incorporado a las cadenas

nucleotídicas en síntesis (Shu *et al.* 2008; Leyssen *et al.* 2008; Aljabr *et al.* 2016).

La Ribavirina fue licenciada por la FDA en 1986 para el tratamiento de niños con bronquiolitis causada por VRS. Sin embargo, en 2006, la Academia Americana de Pediatría recomendó no utilizar dicho compuesto en forma rutinaria en niños con bronquiolitis debido a su limitada efectividad y a que, a nivel poblacional, el riesgo asociado al uso de esta droga superaba los beneficios (American Academy of Pediatrics 2006). Dentro de los inconvenientes asociados al uso de la Ribavirina se puede destacar su baja eficiencia, el hecho de que genera toxicidad inespecífica y que produce efectos secundarios como el desarrollo de anemia hemolítica, disnea, depresión y debilidad (Lee *et al.* 2017). A pesar de esto, a falta de otros tratamientos la Ribavirina sigue siendo utilizada hoy en día para prevenir y combatir las infecciones por VRS en individuos con alto riesgo de desarrollar una patología severa.

### **3.2.4.3.2 Palivizumab**

El Palivizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado cuyo blanco es la proteína F de VRS. Como dicha proteína es muy conservada, el fármaco es capaz de neutralizar la mayoría de las cepas de VRS, pertenezcan tanto al serotipo A como B. A su vez, el epítipo sobre el cual actúa el Palivizumab es un sitio compartido por las proteínas F de pre- y post-fusión, lo cual amplía el rango de acción. Su actividad antiviral está dada principalmente por su capacidad neutralizante, ya que al interaccionar con la proteína F presente en la envoltura viral interfiere con el proceso de fusión de las membranas y por tanto en la entrada del virus a la célula (Hashimoto *et al.* 2017). La producción de este anticuerpo fue realizada en células B de ratón inducidas a través de la inmunización de dicho animal con VRS humano. Luego de la selección del anticuerpo a producir se lo humanizó, es decir que se lo modificó de forma tal que presenta un 95% de homología con los anticuerpos humanos (Resch 2017).

El Palivizumab fue el primer anticuerpo monoclonal humanizado que resultó efectivo contra enfermedades infecciosas. Fue licenciado en 1998 para uso profiláctico y aprobado en 45 países hacia el año 2000 (Simões *et al.* 2002). Se ha demostrado que su uso puede disminuir en un 55% las tasas de hospitalizaciones por VRS, sin embargo, al no ser una droga efectiva para todos los niños, tener un costo elevado y requerir de una re-administración mensual para prevenir la diseminación viral, su uso es limitado y en la mayoría de los países es prescrito solamente para casos de alto riesgo (Gomez *et al.* 2014).

### **3.2.4.4 Antivirales en desarrollo**

Actualmente, son varias las drogas que se están intentando generar contra VRS, sin embargo, solo algunas de ellas se encuentran en etapas avanzadas de investigación o cursan diferentes fases en ensayos clínicos.

Al igual que para el caso de las vacunas, la mayoría de estos compuestos tienen como blanco a la proteína F. Dentro de estas drogas algunas se encuentran en ensayos clínicos de Fase I, como por ejemplo BTA-9881 (NCT00504907) y MDT-637 (NCT01556607). Por otro lado, hay varios inhibidores que se encuentran en ensayos clínicos de fase II, como lo

son: AK-0529, el cual está siendo evaluado en niños hospitalizados por VRS (NCT02654171), como también en pacientes adultos (NCT03699202); BTA-C585, el cual fue administrado a voluntarios sanos luego de haberles sido administrado la cepa RSV-AMemphis37b de forma intranasal (NCT02718937); y RV521, una droga experimental que también fue evaluada en individuos con infecciones inducidas con un modelo de VRS de prueba (NCT03258502). Otras drogas que han cursado ensayos clínicos de fase II y para los cuales ya hay resultados publicados son JNJ-53718678 (NCT02387606) y GS-5806 (NCT01756482). Dichos análisis han documentado una disminución en la carga viral y una mejora en los síntomas clínicos en adultos infectados con un modelo clínico de VRS (Stevens *et al.* 2018; DeVincenzo *et al.* 2014) Otro fármaco en desarrollo es el nanobody ALX-0171, el cual fue probado anteriormente en niños pequeños y adultos inmunocomprometidos. Estos ensayos demostraron el efecto antiviral del ALX-0171 y arrojaron buenos resultados en cuanto al perfil de seguridad y tolerabilidad (Van Heeke *et al.* 2017). Esto llevó a que ALX-0171 pasará a estudios de fase II (NCT03418571, NCT02979431), los cuales han concluido recientemente, pero cuyos resultados no han sido publicados todavía.

A pesar de que la proteína F es el blanco más común para el diseño de fármacos contra las infecciones por VRS, también se están intentando generar una gran cantidad de drogas que actúan interaccionando con otros componentes virales. Un ejemplo es ALS-008176 (DeVincenzo *et al.* 2015), el cual tiene como blanco a la ARN polimerasa viral. Este compuesto es un análogo de nucleótido que al ser incorporado en una cadena de ARN viral en síntesis genera la terminación de la cadena, inhibiendo así la replicación de VRS. Esta droga fue evaluada en estudios de fase II en una población adulta y demostró una buena eficacia en su poder de reducción de la carga viral de VRS, como también en el mejoramiento de los síntomas clínicos de los individuos (Arasaratnam *et al.* 2013). También hay otros fármacos que tienen como blanco a la polimerasa viral pero no son análogos de nucleótidos, sino que tienen otros modos de acción. Este es el caso de PC786, el cual se encuentra bajo estudios clínicos de fase I /II con un modelo de ensayo clínico en adultos (NCT03382431).

Debido a su rol central como articulador/regulador de la unión del ARN a la polimerasa viral durante la transcripción/traducción, la proteína N también puede ser un blanco interesante para el desarrollo de drogas contra VRS. Un fármaco que utiliza este blanco es el RSV-604, una benzodiazepina que fue probada en estudios de Fase II en pacientes trasplantados en el año 2006. Aunque el ensayo reportó una disminución de la carga viral y de los síntomas clínicos en los pacientes, no se han registrado más ensayos con esta droga hasta la fecha (Nicholson *et al.* 2018). Otra forma de disminuir la carga viral es mediante la inhibición en la formación de la nucleocápside viral. Este es el caso de ALN-RSV01, un pequeño ARN de interferencia que tiene como blanco al ARNm que codifica a la proteína N (Gottlieb *et al.* 2016). Hasta la fecha ha sido probado en estudios clínicos de fase II sobre pacientes adultos trasplantados de pulmón. En dichos ensayos no se vieron diferencias entre el grupo de pacientes tratado y el grupo placebo, sin embargo, esto sí había ocurrido en estudios anteriores (Fougerolles *et al.* 2016).

En su conjunto, estos datos demuestran la gran variedad de estrategias que se están utilizando para la generación de fármacos contra VRS. Como se puede observar, varias drogas están siendo evaluadas en ensayos clínicos, aunque aún no se sabe si alguna de ellas logrará ser aprobada para su uso en la población, razón por la cual el desarrollo y validación de nuevas drogas sigue siendo una necesidad.

## 3.3 Virus Influenza

### 3.3.1 Epidemiología e importancia clínica

El virus de influenza es un virus de carácter estacional, el cual se estima que infecta a un billón de personas cada año, resultando en unas 500.000 muertes a nivel mundial (Rafeek *et al.* 2017). Además, este virus respiratorio ha dado lugar a varias pandemias a lo largo de la historia, siendo el primer registro hacia el siglo V A.C. En el siglo XX han ocurrido tres grandes pandemias (en los años 1918, 1957 y 1968), de las cuales la de 1918, comúnmente llamada “Gripe Española”, fue la de mayor impacto. Esta pandemia resultó en 50 millones de muertos aproximadamente, valor que supera incluso al número de difuntos estimados durante la primera guerra mundial. Por otro lado, en el siglo XXI ha ocurrido una sola pandemia (en 2009), la cual fue generada por el surgimiento y esparcimiento global de una nueva variante de influenza llamada A(H1N1)pdm09. Se estima que esta pandemia causó la muerte de 575 mil personas aproximadamente (Saunders-Hastings *et al.* 2016).

El hecho de que el virus influenza cause epidemias y pandemias está estrictamente asociado a la fuerte tendencia que tiene el virus de sufrir cambios antigénicos, como también a la gran eficiencia de infección que posee el virus, lo cual facilita los eventos de contagio dentro de la población (Petrova *et al.* 2018). Dichos cambios antigénicos están dados por dos mecanismos principales: 1) la acumulación progresiva de mutaciones puntuales en el genoma viral, que dan lugar a cambios estructurales en las proteínas virales (principalmente sobre HA y NA), proceso que ocurre frecuentemente y da lugar a cambios antigénicos pequeños que llevan a la deriva antigénica del virus y la generación de epidemias; 2) los eventos de re-ordenamiento entre distintas cepas de influenza que ocurren en casos de co-infección, en los que el intercambio de segmentos genómicos provenientes de los dos virus “parentales” lleva al surgimiento de una progenie viral con una nueva configuración genética que puede resultar en diferencias antigénicas (especialmente al darse entre cepas humanas y animales), generándose así saltos antigénicos que pueden dar lugar a pandemias (El Ramahi *et al.* 2019).

El virus influenza infecta a individuos de todas las edades, sin embargo, al igual que pasa con VRS la población infantil (en este caso principalmente los mayores de 5 años) y los adultos mayores a 65 años son los que presentan una mayor susceptibilidad a la infección y quienes corren mayor riesgo de desarrollar enfermedades severas (Sandhu *et al.* 2001).

### 3.3.2 Características generales

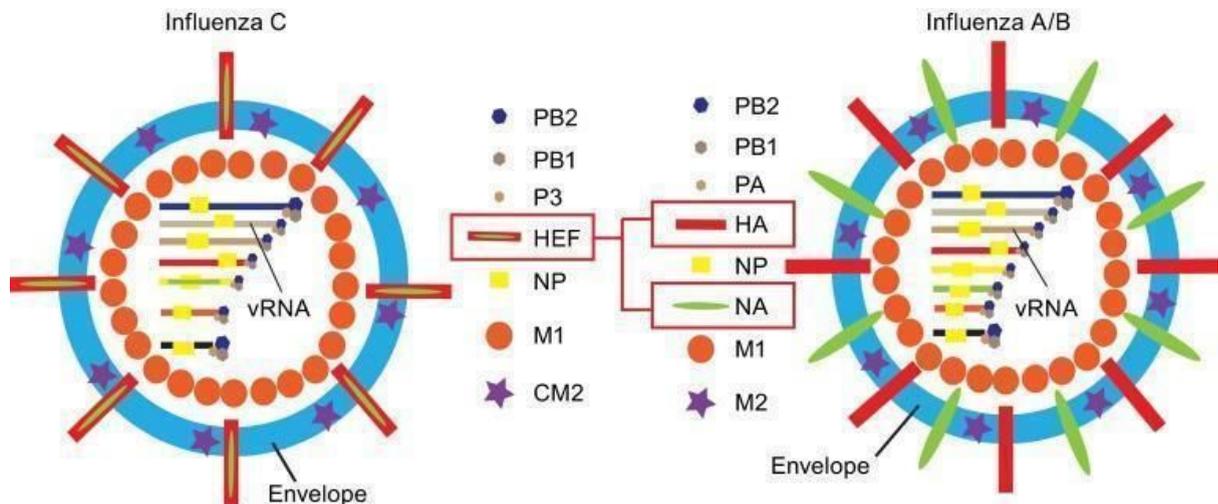
El virus influenza, también llamado comúnmente “virus de la gripe”, es un patógeno que representa un problema mayor de salud pública. Se estima que este virus es el responsable directo de unas 500.000 muertes cada año a nivel mundial (Rafeek *et al.* 2017) y genera además un impacto económico significativo en términos de morbilidad y costos médicos asociados, así como también debido a la gran cantidad de recursos destinados a la investigación, generación de tratamientos y vacunas asociadas a este. El virus influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, dentro del orden *Articulavirales* y como tal presenta

un genoma de ARN simple hebra segmentada y de polaridad negativa. Los tres subtipos que circulan en humanos son A, B y C, siendo los subtipos A y B los que están asociados a la mayoría de las infecciones causadas por ese virus y los que generan enfermedades más severas (Wright *et al.* 2013).

Los virus influenza de tipo A pasaron al humano a través de saltos interespecie desde cerdos y aves. Dichos eventos han causado grandes pandemias, como por ejemplo la llamada “Gripe Española” de 1918 y la “Gripe Porcina” del 2009, a partir de las cuales los virus pasaron a circular de manera estacional. Dentro de los virus de influenza A también existen varios subtipos, los cuales son determinados en base a la combinación de dos glicoproteínas virales presentes en la superficie del virión: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Hasta la fecha se han registrado 18 tipos de HA y 11 de NA, todos circulantes en la población de aves salvajes, el principal reservorio de este virus. En humanos se han registrado principalmente tres combinaciones a nivel mundial (A/H1N1, A/H2N2 y A/H3N2) (Russell *et al.* 2014; Tong *et al.* 2013), sin embargo, algunos brotes específicos también han sido reportados. Por ejemplo, se ha visto un esparcimiento de virus influenza H5 de origen aviar altamente patogénico en Norte América, se han detectado también infecciones zoonóticas de H10N8 y H5N6, infecciones H7N9 en China y H5N1 en algunas partes de Asia y Medio Oriente (Joseph *et al.* 2017). Por otro lado, el virus influenza B fue aislado por primera vez en 1940 y presenta dos linajes (B/Victoria y B/Yamagata) surgidos por divergencia hacia el año 1970 (Biere *et al.* 2010). Este subtipo circula principalmente en humanos, sin embargo, varios estudios han revelado que las focas podrían ser un reservorio animal para este virus (Sharabi *et al.* 2016).

Influenza es un virus pleomórfico y envuelto. La forma más abundante del virus es esférica, con un diámetro promedio de 100 nm aproximadamente y una relación axial de 1:2, mientras que la siguiente clase predominante presenta morfología filamentosa con una relación axial de 1:4. Al observar las partículas virales al microscopio electrónico se observan unas espinas muy características, las cuales están formadas por las proteínas de superficie, HA y NA (Nayak *et al.* 2009). Tanto el genoma de influenza A como el de B presentan 8 segmentos de ARN, mientras que influenza C presenta solo 7 (Figura 3). Cada uno de los segmentos contiene un gen que puede codificar para una o varias proteínas virales, dependiendo de si existen marcos abiertos de lectura o señales de *splicing*. Cada segmento contiene además regiones no codificantes en los extremos 5' y 3'. Dentro del genoma viral, hay tres segmentos de ARN que corresponden a los genes codificantes de las proteínas de la ARN polimerasa viral (PA, PB1 y PB2 en el caso de influenza A y B; y P3, PB1 y PB2 para influenza C). Además, influenza presenta un segmento para cada uno de los genes HA, NP, NA, M y NS (a excepción de influenza C en el cual HEF sustituye a HA y NA) (Savy *et al.* 2014).

A partir de los genes mencionados se sintetizan todas las proteínas virales. La mayoría de los genes codifican una única proteína, la cual presenta el mismo nombre que el gen precursor, sin embargo, hay algunas excepciones. Este es el caso de los genes M y NS, los cuales dan lugar a la síntesis de dos proteínas cada uno (M1 y M2 para el caso del gen M; y NS1 y NS2 para el caso de NS) mediante la utilización de mecanismos de *splicing* (Valcárcel *et al.* 2016). Por otro lado, debido a la presencia y utilización de varios marcos abiertos de lectura en el gen PB1, varias proteínas pueden ser también sintetizadas dependiendo de la cepa viral. Hasta la fecha se han identificado siete: PB1-F2, PB1-N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 y NS3 (Vasin *et al.* 2014). Estas últimas, no son codificadas por todos los virus influenza, por lo que son consideradas proteínas accesorias. Por último, en los virus influenza B se sintetiza una proteína de superficie llamada NB, la cual es generada a partir del gen NA mediante la utilización de marcos abiertos de lectura (Elderfield *et al.* 2016).



**Figura 3. Estructura de Influenza.** Esquema de la estructura de los viriones de influenza A, B y C, en donde las proteínas simbolizadas con un mismo pictograma presentan la misma función (Wang *et al.* 2016).

Las distintas proteínas virales presentan actividades y funciones particulares. Así, cada una de las proteínas que componen a la ARN polimerasa presenta una actividad específica: PA y P3 presentan actividad endonucleasa y proteasa; PB1 permite la elongación de las cadenas nucleotídicas en síntesis; y PB2 está asociada al reconocimiento del CAP (siendo el CAP un nucleótido de guanina metilado unido al ARNm por su extremo 5' mediante un enlace 5'5' trifosfato, el cual cumple diversas funciones relacionadas con el metabolismo del ARNm, entre ellas el reconocimiento de dicha macromolécula por parte de la polimerasa para dar lugar a su traducción). Por otro lado, se encuentran las proteínas de superficie: HA, la cual es una glicoproteína que al interactuar con receptores celulares media la fusión de la membrana viral y celular y participa también en el ensamblaje del virión; NA, glicoproteína que presenta actividad neuraminidasa permitiendo la liberación de la progenie viral al medio extracelular; M2, la cual forma canales iónicos y participa tanto en la fusión virus-célula como en el proceso de ensamblaje de los virus; y en el caso de influenza C, la proteína HEF, la cual suple en función a las proteínas NA y HA de los virus de subtipo A y B. Influenza presenta también otras proteínas como lo son: M1, la cual forma la matriz del virión y a su vez interactúa con el complejo ribonucleoprotéico permitiendo el ensamblaje de los viriones hijos; la nucleoproteína NP, la cual interactúa con el ARN viral protegiéndolo y permitiendo su síntesis; NS1, la cual funciona principalmente como antagonista de los interferones, modulando así la respuesta celular e inmunitaria del hospedador; y por último la proteína NS2 la cual participa en la exportación nuclear de los complejos ribonucleoproteicos y regula la síntesis de ARN viral. Para el caso de influenza B, existe además otra proteína llamada NB cuya función en el ciclo replicativo de influenza es aún desconocida (Wright *et al.* 2013).

Debido a sus propiedades inmunogénicas, HA y NA son las más utilizadas como blanco para el diseño de vacunas y antivirales.

Por un lado, HA es una proteína de fusión de clase I, la cual cataliza el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal de la célula blanco durante el proceso de infección. HA está compuesta por tres monómeros, cada uno formado por una subunidad de unión (HA1) y una subunidad de fusión (HA2) (Doms *et al.* 1986). Ambas subunidades son producidas a través del procesamiento proteolítico de un precursor HA0, el cual es

fusogenicamente inactivo. HA2 presenta una región central compuesta por alfa-hélices la cual se encuentra anclada a la membrana viral y también un extremo N terminal (HAfp). Ante la acidificación del PH endosomal, HAfp cambia de posición y se ancla a la membrana de dicho compartimiento, acercando así las membranas y dando lugar al proceso de fusión que permite la entrada del virus a la célula (Worch 2014).

La importancia de la actividad de HA en la infección generada por influenza se ve reflejada en el hecho de que al ser impedido el funcionamiento de dicha proteína, ya sea a través de un procesamiento post-traducciona l incompleto o por la generación de mutaciones sobre ella, las partículas virales producidas son no infectivas (Wright *et al.* 2013). Esto ha llevado a que gran parte de la investigación dedicada al desarrollo de fármacos contra influenza ha intentado suprimir la actividad de HA, para impedir así el proceso de adhesión o fusión del virus a la membrana endosomal. Además, la generación de anticuerpos terapéuticos o de anticuerpos naturales inducidos por la vacunación tienen muchas veces a HA como blanco (principal antígeno viral), ya que presentan una alta actividad neutralizante, lo cual ayuda a prevenir y combatir las infecciones virales (Yamayoshi *et al.* 2019).

En cuanto a la NA, esta es una glicoproteína transmembrana tetramérica compuesta por cuatro subunidades idénticas. Cada una de ellas presenta cuatro regiones principales: una cola citoplasmática, una región transmembrana, un tallo y una cabeza globular que contiene el sitio activo de la enzima. Los aminoácidos que componen al sitio activo de NA son muy conservados a lo largo de todas las cepas de influenza y se disponen en el centro de cada subunidad, formando un bolsillo profundo (Air 2012). La función de NA es mediar el procesamiento o corte de los residuos terminales de ácido siálico presentes en las membranas celulares y virales, facilitando la liberación de los virus hijos a partir de las células infectadas. Además, algunos estudios han demostrado que NA también facilita la fusión e invasión de las células en los eventos de infección (Matrosovich *et al.* 2004). En conjunto estos factores hacen que NA juegue un rol muy importante en la diseminación del virus influenza.

### 3.3.3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de influenza comienza con la adhesión del virus a la célula a infectar. Dicho proceso implica la unión de HA con ácidos neurámicos (ácidos siálicos) presentes en la superficie celular. Como HA es una proteína poco conservada hay distintas variantes, las cuales presentan afinidad diferencial hacia los distintos tipos de enlaces glucídicos presentes en dichas moléculas. Esto es de suma relevancia, ya que se ha visto que la HA de los virus que replican en diferentes especies presentan especificidad hacia distintos tipos de enlaces. Así, mientras que los virus de influenza humanos se unen preferentemente con ácidos N-acetilneurámicos unidos a azúcares de galactosa mediante enlaces  $\alpha 2,6$  (SA $\alpha 2,6$ Gal), los virus aviares se unen mayormente al ser los enlaces de tipo  $\alpha 2,3$  (SA $\alpha 2,3$ Gal) (Graaf *et al.* 2014). Además, se ha observado que las células epiteliales humanas poseen mayormente SA $\alpha 2,6$ Gal, mientras que las células epiteliales de patos (mayor reservorio aviar del virus) presenta mayor cantidad de SA $\alpha 2,3$ Gal (Wright *et al.* 2013). Aun así, dicha especificidad viral no es absoluta y las células aviares y humanas pueden contener ambos tipos de enlace, lo cual permite que pueda darse la co-infección de células por virus humanos y aviares, dando lugar a la posibilidad de que ocurran eventos de re-ordenamiento génico.

La fusión de la envoltura de influenza con la membrana celular es un proceso dependiente

del PH, requiriéndose valores ácidos, lo cual determina que la entrada del virus sea por vía endosomal. Así, en los virus de influenza A y B, la acidificación del endosoma a valores de PH menores a 5.5 lleva a un cambio conformacional en HA, la cual media el proceso de fusión entre las membranas del virus y el endosoma, llevando a la entrada de los componentes virales hacia el citosol (Yoshimura *et al.* 1984; Stegmann *et al.* 1986). Para el caso de influenza C, el mecanismo de adhesión y fusión es muy similar, con la diferencia de que es la proteína HEF (y no HA) la que media dichos procesos, y que lo hace mediante la interacción con ácidos neurámicos 9-O-acetilados. Además, el PH necesario para la fusión de influenza C parecería ser mayor, por lo cual el evento de fusión se daría en endosomas más tempranos (Wang *et al.* 2016).

Una vez que el virus entra a la célula los complejos ribonucleoprotéicos (vRNPs) son transportados hacia el núcleo, lugar en el cual se da la síntesis de ARN viral. El hecho de que el ciclo replicativo de influenza requiera de la entrada al núcleo es una característica inusual para los virus con genoma a ARN y requiere que las proteínas virales de los vRNPs tengan señales de importación nuclear que sean reconocidos por la maquinaria celular (Cros *et al.* 2003).

Dentro del núcleo las cadenas de ARN genómico (de polaridad negativa) son transcritas dando lugar a ARNs complementarios, los cuales pueden ser poliadenilados y encapuchados generando ARNm que permitirán la síntesis de proteínas virales mediante el proceso de traducción. Dichos ARNs son utilizados también como molde para la generación de ARN genómico. El ARN viral se encuentra siempre asociado con NP y con las proteínas que componen la polimerasa viral. Luego de la replicación, los nuevos vRNPs que fueron ensamblados en el núcleo son exportados hacia el citoplasma, mecanismo mediado por la proteína NS2 (Cros *et al.* 2003).

La síntesis de ARNm y proteínas correspondientes a los genes NP y NS1 es favorecida en los primeros estadios de la infección, mientras que la síntesis de estos componentes para HA y NA y particularmente de M1 es retrasada. Esta expresión diferencial está relacionada con las funciones específicas que cumple cada proteína durante el ciclo viral. Por un lado, y como se mencionó anteriormente, NP es necesaria para la replicación y NS1 juega un rol importante en el combate contra la respuesta inmune, lo cual genera que estas proteínas sean necesarias en etapas tempranas del ciclo. Por otro lado, se ha visto que M1 inhibe la transcripción viral, lo cual demanda que su expresión se de en etapas más tardías. De esta forma, cuando la proteína M1 se acumula, se inhibe la generación de ARNm, terminando el ciclo de replicación e iniciándose la exportación de vRNPs desde el núcleo para ser incorporados a los nuevos virus en formación (Wright *et al.* 2013).

De esta forma, tanto los vRNPs como las proteínas virales son llevados hacia las balsas lipídicas presentes en la membrana citoplasmática, lugar en el cual se dará el ensamblaje de los virus. Allí son ancladas las proteínas de superficie viral, las cuales parecerían interactuar mediante sus colas citoplasmáticas con la proteína M1, la cual forma la matriz de los virus. M1 contacta también con los vRNPs, haciendo así de puente entre los componentes del core interno y las proteínas de membrana. Por esta razón, se propone que M1 juega un rol importante en el ensamblaje viral, mediando el reclutamiento de los componentes virales hacia las balsas lipídicas presentes en la membrana plasmática, las cuales son los sitios de ensamblaje y posterior fisión viral. Influenza se ensambla y libera únicamente sobre la membrana citoplasmática apical de las células epiteliales (Nayak *et al.* 2009). Este proceso asimétrico parecería ser un factor muy importante en la patogénesis y el tropismo tisular de este virus, restringiendo la infección y limitando la generación de enfermedades sistémicas.

### 3.3.4 Prevención y Tratamiento

La vacunación es la principal forma de prevención y control de las infecciones virales generadas por influenza. La comúnmente conocida como “vacuna de la gripe” induce un buen grado de protección (60-80% de eficacia, dependiendo de la temporada y franja etaria analizada) en individuos sanos y son bien toleradas por los receptores (Cox *et al.* 2004; Osterholm *et al.* 2012). Debido a la naturaleza altamente variable del virus influenza, la composición de la vacuna debe ser rediseñada cada año teniendo en cuenta las cepas de A/H1N1, A/H3N2 y B con mayor probabilidad de circular en la próxima temporada epidémica.

Las opciones de tratamiento dependen de la severidad de la infección. Las enfermedades moderadas pueden ser manejadas en casa con cuidados especiales, incluyendo el descanso, un adecuado consumo de fluidos y el uso de paracetamol para controlar la fiebre y la mialgia. Para individuos con enfermedades más severas o para niños con factores de riesgo se puede requerir hospitalización y el mantenimiento controlado de la hidratación y oxigenación, tanto como el uso de antipiréticos o drogas antivirales (Kumar 2016).

Hasta el 2018 solo existían dos clases de antivirales contra influenza aprobadas por la FDA. Estas drogas presentan como blanco a las proteínas virales M2 y NA respectivamente. Por un lado, la Amantadina y Rimantadina son drogas inhibidoras de M2, las cuales actúan únicamente contra la cepa A de influenza (Schnell *et al.* 2008), mientras que el Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir y Laninamivir son fármacos inhibidores de NA y actúan contra las cepas de influenza A y B (McKimm-Breschkin 2012). Dentro de estos el Oseltamivir es el más utilizado, debido a su amplia disponibilidad y a su fácil administración oral. Recientemente, se ha aprobado una nueva droga llamada Baloxavir marboxil (Xofluza). Dicho fármaco es un inhibidor de la proteína PA, el cual es de administración oral y está comenzando a ser utilizado para el tratamiento de estas infecciones en individuos mayores a 12 años (<https://www.pharmaceuticalonline.com>).

#### 3.3.4.1 Vacunas aprobadas contra Influenza

Como influenza virus presenta una gran variabilidad genética, la composición de las vacunas utilizadas para combatirlo necesita ser actualizadas cada año con el fin de que coincidan antigénicamente las cepas virales presentes en la vacuna con aquellas que circulan en cada temporada epidémica (Skowronski *et al.* 2016). Para ello, la OMS (“Organización Mundial de la Salud”) hace un estudio de las cepas circulantes y recomienda una selección para su inclusión en la vacuna.

Tres tipos de vacunas están actualmente aprobados por la FDA: vacunas a base de la proteína HA recombinante, vacunas a base de virus influenza inactivados (IIVs del inglés “Inactivated Influenza Vaccines”) y vacunas a base de virus influenza atenuados (LAIVs del inglés “Live Attenuated Influenza Vaccines”) (Barberis *et al.* 2016). La IIV fue licenciada en 1940 y es la vacuna más común para la inmunización contra influenza. Tanto esta vacuna como aquellas a base de la proteína HA son generadas mediante la co-infección de huevos de gallina embrionados con una cepa del virus recomendada por la OMS y un virus de alta capacidad replicativa, como por ejemplo A/Puerto Rico/8/1934 H1N1. Luego de 2 o 3 días de infección, son seleccionados los virus recombinantes que portan los 2 segmentos génicos

codificantes de HA y NA de la cepa circulante (OMS) y los otros 6 del virus de alta capacidad replicativa. Dicho proceso se realiza utilizando anticuerpos contra las dos proteínas mencionadas. Luego el virus es concentrado e inactivado mediante la utilización de formaldehído o  $\beta$ -propiolactona (Wong *et al.* 2013).

Por otro lado, las LAIVs son administradas nasalmente e imitan la ruta natural de infección por influenza. La estrategia de producción de estas vacunas está basada en la co-infección de huevos de gallina con una cepa OMS candidata y un “master donor virus” (MDV). Este último es un virus atenuado (mediante la inducción de ciertas mutaciones en su genoma) cuya temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 25 y 33 °C y su capacidad de replicación entre 37 y 39 °C es limitada, razón por la cual solo pueden infectar en forma eficiente el aparato respiratorio superior (en el cual no llegan a causar la enfermedad), pero no se transmiten/replican eficazmente en las vías respiratorias bajas. (Murphy *et al.* 2002). Mediante este proceso de co-infección se obtienen virus recombinantes portadores de los genes NA y HA de la cepa OMS y el resto de los genes pertenecientes a la cepa MDV. De esta forma los virus seleccionados generan una buena inmunización contra las cepas de interés, pero son virus atenuados que no llegan a causar una patología clínica en el individuo vacunado (Jin *et al.* 2014). Aun así, cada vez que la OMS elige una nueva cepa de influenza para ser incorporada a una LAIV, el virus recombinante seleccionado debe ser testeado para asegurarse de que las mutaciones del MVD no se hayan perdido en la recombinación viral, y las vacunas son además evaluadas clínicamente para probar su seguridad antes de ser administrada a la población.

El diseño de la composición de la vacuna se realiza aproximadamente nueve meses antes de la época de vacunación con el fin de tener el tiempo suficiente para la producción, distribución y administración de las vacunas. Actualmente, son cuatro los subtipos de influenza que circulan en humanos: dos cepas de influenza A (H1N1 y H3N2) y dos de influenza B (Victoria y Yamagata). Las vacunas pueden ser tri- o tetravalentes, dependiendo de cuántas cepas sean utilizadas para formulación. De esta forma las vacunas trivalentes presentan antígenos pertenecientes a los dos linajes de influenza A y a uno de los linajes de influenza B. Por otro lado, las vacunas tetravalentes presentan antígenos de los cuatro linajes virales, generando un mayor espectro de protección (Barberis *et al.* 2016). Se intenta que los virus presentes en las preparaciones sean los mismos que los virus que circularán al momento de generar la inmunización, evitando así la generación de epidemias o al menos minimizando su impacto. Sin embargo, el largo período de producción puede dar lugar a que surjan nuevas variantes dominantes entre los virus circulantes, resultando en una menor eficacia en la protección (Ampofo *et al.* 2011). Además, el uso de huevos de gallina para la replicación de virus humanos puede llevar a cambios antigénicos indeseados (Skowronski *et al.* 2016). En conjunto, estos factores hacen que sea importante generar nuevos métodos de producción que no presenten estas desventajas.

### **3.3.4.2 Vacunas en desarrollo**

Más allá de las vacunas de temporada actualmente autorizadas, varias vacunas candidatas contra influenza se encuentran actualmente en desarrollo preclínico y clínico. Una de ellas es llamada TriFluvac. Esta es una vacuna trivalente contra influenza, la cual se basa en virus inactivados de las cepas A/H1N1, A/H3N2 y una cepa de influenza B. Actualmente está cursando un ensayo de fase II/III en Tailandia (NCT03390166), en el cual se está evaluando su inmunogenicidad y seguridad en adultos sanos.

Por otro lado, recientemente han concluido varios ensayos clínicos de fase II/III en los cuales se ha evaluado la inmunogenicidad y seguridad de varias preparaciones en individuos de distintos rangos etarios. Dentro de ellos se puede destacar el ensayo de una vacuna antigripal tetravalente utilizada para la inmunización de individuos de 6 meses a 17 años de edad, llevado a cabo por Sanofi Pasteur (NCT03391193). Por otro lado, y como vacuna utilizada para la prevención en adultos se puede mencionar la vacuna generada por GSK llamada GSK2340272A (NCT00968526). Otro ensayo clínico con resultados prometedores ha evaluado la preparación GSK2186877A en adultos mayores de 60 años (NCT00938392). Por último, dos ensayos clínicos de fase II han culminado recientemente en los cuales se ha evaluado una vacuna cuadrivalente a base de partículas de tipo viral (VLP) de origen vegetal. En dichos ensayos se probó la inmunogenicidad y seguridad de dicha vacuna candidata en adultos de 18 a 49 años y  $\geq 50$  años, obteniéndose una buena respuesta celular y humoral y un perfil de seguridad adecuado, razón por la cual pasó a ensayos clínicos de fase III (Pillet *et al.* 2019).

Como se puede observar, la necesidad de mejorar la eficacia y cobertura de la vacunación contra influenza constituye un motor permanente para la investigación y desarrollo de esta temática a nivel mundial. Sin embargo, la variabilidad intrínseca del virus influenza derivada de su gran capacidad mutacional, hace necesaria una evolución constante de las estrategias de producción de vacunas para lograr combatirlo y generar una buena protección a nivel poblacional.

### **3.3.4.3 Antivirales aprobados por la FDA contra influenza**

#### **3.3.4.3.1 Antivirales contra M2**

La Amantadina y Rimantadina son antivirales cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de los canales iónicos generados por la proteína M2 de influenza, previniendo así la liberación de los componentes virales (incluyendo su material genético) hacia el citoplasma de las células blanco (Schnell *et al.* 2008). Dichos fármacos actúan únicamente contra los virus de influenza A, y no de influenza B, debido a diferencias estructurales en los canales iónicos de ambos subtipos (Wang *et al.* 2009). Debido a la recurrente resistencia reportadas en los virus circulantes, el uso clínico de estas drogas para el tratamiento de influenza ya no es recomendado (El Ramahi *et al.* 2019).

#### **3.3.4.3.2 Antivirales contra NA**

Dentro de los antivirales utilizados para el tratamiento de influenza, los inhibidores de la NA son los más comunes. Estas drogas actúan mediante el bloqueo del sitio activo de la enzima, previniendo así la liberación y diseminación de los viriones. Los tres medicamentos de este tipo aprobados para el tratamiento de influenza a nivel mundial son el Zanamivir (Relenza), Oseltamivir (Tamiflu) y Peramivir (Rapivab). El Zanamivir fue el primer inhibidor de NA en ser sintetizado, y se hizo en base al DANA (del inglés “deoxy dehydro N-acetyl neuramic acid”) y la estructura cristalizada del complejo formado por NA y el ácido siálico.

Este fármaco tiene la limitación de no poder ser administrado oralmente, factor que dio lugar al diseño del Oseltamivir. Posteriormente fueron lanzados al mercado el Peramivir y Laninamivir, siendo este último una droga aprobada para el tratamiento de influenza solo en algunos países, como por ejemplo Japón (McKimm-Breschkin 2012). Debido a que el uso de Zanamivir no es recomendado para niños menores de 7 años ni tampoco para individuos con condiciones respiratorias subyacentes y a que la inyección de Peramivir es priorizada en pacientes hospitalizados que no pueden recibir tratamiento oral, hoy en día el antiviral más utilizado a nivel mundial es el Oseltamivir (McKimm-Breschkin 2012; <https://www.cdc.gov/flu>)

En cuanto al espectro de acción, como los aminoácidos involucrados en la función catalítica de NA son conservados entre los subtipos de influenza A y B, los fármacos que actúan a través de la inhibición de esta enzima presentan actividad antiviral contra ambos subtipos virales. Aun así, debido a la gran variabilidad genética entre las cepas de influenza y a su rápida evolución, suelen existir variantes resistentes del virus. Así, de acuerdo con un estudio de susceptibilidad realizado durante las epidemias de 2013 y 2014, aproximadamente el 98% de los virus circulantes fueron sensibles a los cuatro antivirales y solo un 2% mostró resistencia al menos hacia una droga, siendo generalmente el Oseltamivir (Takashita *et al.* 2015). Aunque la resistencia es relativamente baja, es de esperar que dicho valor aumente en el futuro, debido al incremento en el uso de estos fármacos en los últimos tiempos.

A pesar de que los inhibidores de NA son utilizados actualmente para el tratamiento de influenza, su eficiencia es controversial, sobre todo luego del meta-análisis clínico publicado en 2014 por Cochrane, el cual reportó que el uso de estos fármacos genera solo una mínima disminución de los síntomas causados en niños y adultos con infecciones moderadas y ningún cambio en pacientes hospitalizados (Jefferson *et al.* 2014).

### **3.3.4.3.3 Antiviral contra PA**

En octubre de 2018 la FDA aprobó un nuevo fármaco para el tratamiento de las infecciones generadas por influenza en pacientes mayores a 12 años sin enfermedades médicas subyacentes (<https://www.pharmaceuticalonline.com>). De esta forma, el Baloxavir marboxil (Xofluza) es el primer medicamento contra la gripe aprobado en casi 20 años. Dicho fármaco es un inhibidor selectivo de la actividad endonucleasa de la proteína PA de la polimerasa viral (Noshi *et al.* 2018). En ensayos clínicos de fase II/III, se ha demostrado su capacidad de reducir significativamente la duración de los síntomas de la infección en comparación con el placebo, y presentó una actividad antiviral con eficacia similar al Oseltamivir (Hayden *et al.* 2018). Además, en estudios no clínicos Xofluza ha demostrado tener actividad contra una amplia variedad de virus de la gripe, incluidas las cepas resistentes al Oseltamivir y las cepas aviarias H7N9 y H5N1 (<https://www.pharmaceuticalonline.com>). Aun así, esta droga, al igual que el resto de los fármacos utilizados para el combate de las infecciones virales, no está exento de la posible aparición de variantes resistentes del virus, razón por la cual resulta imprescindible continuar con el desarrollo de antivirales que permitan combatir dichas infecciones a lo largo del tiempo.

### 3.3.4.4 Antivirales en desarrollo

Actualmente, hay en desarrollo muchos fármacos para el combate de las infecciones generadas por influenza virus. Dentro de ellos se pueden destacar algunas drogas como por ejemplo el Favipiravir, Pimodivir, la Nitazoxanida, VIS410 y el Umifenovir.

El Favipiravir es una droga inhibidora de la polimerasa viral, la cual se encuentra cursando ensayos clínicos en Estados Unidos y Europa. Por otro lado, en Japón ha sido aprobado este fármaco en 2014 para la prevención y tratamiento de la gripe pandémica A(H1N1)pdm09 y desde entonces ha sido utilizada para el tratamiento de las infecciones generadas por influenza. Un estudio de Fase III concluido recientemente en Japón y dos estudios de Fase II financiados por el Departamento de Defensa de Estados Unidos, se enfocaron en la evaluación de la eficacia y seguridad de este compuesto para el tratamiento de la gripe en adultos sin enfermedades subyacentes y en pacientes con hepatopatías. Los resultados no han sido publicados todavía (Reina *et al.* 2017).

Otro inhibidor de la ARN polimerasa de influenza es el Pimodivir. Su modo de acción se basa en la interacción con la proteína PB2, bloqueando así la replicación viral sin afectar la respuesta antiviral celular. Este fármaco fue desarrollado en 2014 por Michael P. Clark *et al.* y ha cursado un ensayo clínico de fase II (NCT02342249) a fin de evaluar su actividad antiviral contra virus influenza A en sujetos adultos. A pesar de que los resultados de los ensayos clínicos no se encuentran disponibles todavía, se ha visto que Pimodivir presenta actividad antiviral contra varias cepas de influenza A con valores de IC50% del orden nanomolar en cultivos de macrófagos humanos (Fu *et al.* 2016).

La Nitazoxanida (NTZ) es otra droga de potencial uso terapéutico, la cual presenta actividad antiviral contra virus de influenza A y B, incluyendo la cepa A/H1N1pdm09, como también cepas resistentes a los inhibidores de neuraminidasa (Rossignol 2014). Su mecanismo de acción parecería estar relacionado con la inhibición de la maduración de la proteína HA viral a nivel post-traducciona (Zeng *et al.* 2016). En estudios de fase IIb/III NTZ ha demostrado reducir significativamente el tiempo de resolución de la infección comparado con los grupos placebo (Tilmanis *et al.* 2017).

Por otro lado, una droga que fue evaluada recientemente en ensayos clínicos de fase II es VIS410. Este fármaco es un anticuerpo monoclonal neutralizante cuyo blanco es la proteína HA de influenza virus. El estudio evaluó la seguridad y la tolerabilidad de VIS410 en pacientes adultos no hospitalizados con influenza A no complicada. Los resultados demostraron que su utilización es segura y eficaz contra el virus A/H1N1 humano (Hershberger *et al.* 2019).

Por último, la droga experimental Umifenovir fue estudiada durante la epidemia de 2016-2017 para evaluar el nivel de seguridad de su administración y la eficacia para la prevención de las infecciones por influenza en pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Este fármaco actúa mediante la interacción con HA, inhibiendo el proceso de fusión y por lo tanto la entrada del virus a la célula. En el ensayo mencionado se vio una reducción en la morbilidad, la frecuencia y la gravedad de las infecciones, generando una disminución en el número de hospitalizaciones (Titova *et al.* 2018). Actualmente hay en curso otro estudio de fase III (NCT03787459) para evaluar la eficacia y seguridad de la administración de una preparación basada en Umifenovir y Oseltamivir, en comparación con el Oseltamivir solo, en aproximadamente 200 adultos hospitalizados y pacientes adolescentes con infecciones graves por influenza virus.

Como se puede observar, hay varios antivirales que se encuentran cursando ensayos clínicos para ser probados contra el virus influenza. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, dada la gran variabilidad del virus sigue siendo vital el desarrollo de nuevas formas de tratamiento que puedan ir reemplazando a aquellas que vayan quedando obsoletas debido a la generación de resistencias.

### **3.4 Antecedentes del estudio**

Hasta el momento, todos los antivirales aprobados para el tratamiento de las infecciones respiratorias generadas por VRS e influenza tienen como blanco a alguno de los componentes virales. Hecho que ocurre también con la gran mayoría de compuestos que se encuentran en estudio por su potencial actividad antiviral.

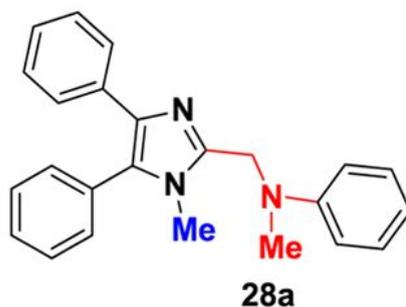
Este tipo de antivirales son generados mediante una metodología clásica en la cual las drogas son diseñadas para combatir a un patógeno en particular y para ello se busca inhibir alguno de los pasos de infección (adhesión, fusión, replicación, etc) mediante la interacción de la droga con algún componente del virus. Esto lleva a dos limitantes en cuanto a su rango de acción. Por un lado, los compuestos suelen presentar una alta especificidad viral, restringiendo su acción a una familia o a ciertos tipos virales. Además, la alta capacidad mutacional que presentan los virus (y especialmente aquellos con genoma de ARN) da lugar a que surjan variantes resistentes a dichos fármacos, limitando el tiempo en el cual dichos compuestos tienen efectividad para combatir las infecciones virales a nivel poblacional.

A raíz de esta problemática, ha surgido un nuevo enfoque para el diseño y desarrollo de fármacos el cual implica la búsqueda de compuestos cuya actividad antiviral esté mediada por cambios a nivel celular y no de la interacción específica con componentes virales. Este tipo de aproximación presenta la ventaja de que, al tener a la célula hospedero como blanco de acción, disminuye enormemente la posibilidad de que se generen resistencias, ya que la tasa de mutación celular es mucho menor que la viral. Además, la posibilidad de que el virus logre sortear un estado celular general desfavorable para su replicación es baja. Otra ventaja que presenta esta metodología es que, al ser los virus patógenos celulares obligatorios dependientes de la gran parte de la maquinaria celular, en el caso de que más de un virus utilice los mismos componentes/vías celulares para su replicación se puede dar lugar a la generación de una única droga que presente actividad antiviral contra varios tipos virales (actividad antiviral de amplio espectro).

El descubrimiento de compuestos con actividad antiviral contra varios virus y cuyos blancos sean componentes celulares puede darse de dos formas. Por un lado, es posible evaluar primero qué compuestos generan cambios a nivel de la expresión génica en las células que puedan suponer un estado celular desfavorable para la replicación viral, y a partir de la selección de dichos compuestos realizar ensayos de actividad antiviral. Sin embargo, también es posible evaluar primero si los compuestos presentan actividad antiviral mixta y luego realizar ensayos más específicos a fin de identificar su potencial mecanismo de acción.

Un ejemplo de la utilización de este segundo tipo de aproximación fue realizado en 2008 por Yoon *et al.* Este grupo de investigación publicó un trabajo en el cual se puso a punto un ensayo para buscar moléculas con propiedades antivirales contra el virus del sarampión

(MV), el cual es un miembro prominente de la familia de los *Paramixovirus*. En dicho trabajo se realizó primero un *screening* de 137.500 compuestos pertenecientes a una biblioteca de moléculas, a partir del cual fueron seleccionados 60 compuestos candidatos. Una nueva ronda de *screening* y la generación de curvas dosis- respuesta redujeron el pool a 35 compuestos con concentraciones activas  $\leq 15.3 \mu\text{M}$  contra la cepa MV-Alaska y con índices de especificidad en un rango de 36 a  $>500$ . Posteriormente, se hicieron ensayos de actividad antiviral contra varios miembros de la familia de los *Pneumovirus* y sus resultados revelaron tres patrones distintos de actividad: 1) bloqueadores exclusivos de MV; 2) inhibidores de MV y virus pertenecientes al mismo género; 3) inhibidores de amplio espectro, con actividad contra géneros diferentes dentro de los *Pneumovirus*. Dentro de este grupo se destacó el compuesto llamado 22407448 (Yoon *et al.* 2008) debido a su gran actividad antiviral (del orden nanomolar) y su amplio espectro de acción (incluyendo influenza y varios paramixovirus). A partir de él y mediante eventos de reedición química y sucesivas evaluaciones se obtuvo un compuesto similar llamado JMN3-003 (Sun *et al.* 2011), el cual a su vez fue modelo para la generación de la molécula 28a (Figura 4). Esta última, presentó valores de EC50% de 0,88 y 0,81  $\mu\text{M}$  contra cepas de Influenza A y sarampión respectivamente. Además, la molécula 28a presentó una buena estabilidad en fracciones de hígado humano con una vida media de 165 minutos. Estos resultados establecieron a la molécula 28a como un buen candidato para las terapias antivirales (Moore *et al.* 2013).



**Figura 4. Estructura química de la molécula 28a (Moore *et al.* 2013).**

Teniendo en cuenta esta línea de investigación, en el Laboratorio de Moléculas Bioactivas de CENUR litoral Norte, fueron sintetizadas moléculas análogas a la 28a, con el fin de generar compuestos con propiedades similares a la molécula de origen, pero con mayor capacidad antiviral y eventualmente un mayor espectro de acción. Cinco de estas moléculas (llamadas 1167, 1175, 1180, 1188 y 1199) fueron analizadas en este trabajo con el fin de evaluar sus propiedades antivirales contra VRS e influenza. Además, otros 65 compuestos fueron seleccionados de la biblioteca de moléculas de dicho laboratorio con el fin de iniciar una nueva ronda de selección a partir de la cual poder generar también antivirales para combatir a los virus mencionados y a otros virus respiratorios.

## **4. OBJETIVOS**

---

### **4.1 Objetivo general**

Estudio de la actividad antiviral de un conjunto de moléculas de síntesis generadas por el Laboratorio de Moléculas Bioactivas de CENUR Litoral Norte contra VRS y el virus influenza.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1) Preparación de stocks virales y titulación de cinco cepas de VRS en células HEp-2.
- 2) Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas de estudio en células HEp-2.
- 3) Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas de estudio contra VRS en células HEp-2 utilizando virus portadores de genes reporteros.
- 4) Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas de estudio contra el virus influenza en células A549 utilizando virus portadores de genes reporteros.

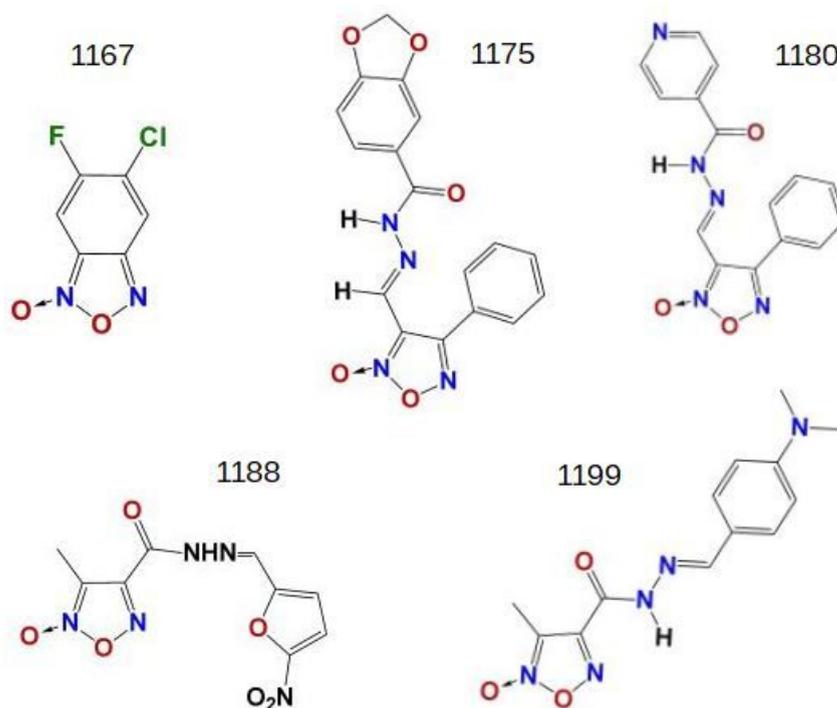
## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 Moléculas

Las moléculas a ser estudiadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Laboratorio de Moléculas Bioactivas de CENUR Litoral Norte y clasificadas en dos grupos en base a su origen.

El primer grupo, que llamaré G1, fue formado por 5 moléculas (llamadas 1167, 1175, 1180, 1188 y 1199) las cuales fueron diseñadas en el laboratorio anteriormente mencionado a partir de la molécula 28a generada por Moore *et al.* en 2013 (Figura 5), mediante la incorporación y eliminación de grupos químicos sobre dicha molécula precursora. Estas 5 moléculas sintetizadas fueron evaluadas en estudios previos en el laboratorio VirPath contra el virus influenza arrojando resultados atractivos, razón por la cual fueron seleccionadas para este estudio.



**Figura 5. Moléculas pertenecientes a G1.** Moléculas sintetizadas a partir del precursor 28a, donde 1167, 1175, 1180, 1188 y 1199 son los nombres de cada compuesto.

El otro grupo de moléculas, llamado G2, fue formado por 65 moléculas seleccionadas a partir de la biblioteca de moléculas del Laboratorio de Moléculas Bioactivas en base a sus estructuras químicas, debido a la presencia de distintos grupos funcionales que podrían dotar a los compuestos de una actividad antiviral.

## 5.2 Células

Para la realización de los ensayos fueron utilizadas dos líneas celulares: HEp-2 (por sus siglas en inglés "Human Epithelioma stain 2 cells", procedentes de un tumor metastásico nodular de laringe) y A549 (las cuales proceden de células epiteliales tomadas de un Adenocarcinoma humano alveolar). Dichas líneas celulares fueron elegidas para el crecimiento de VRS e influenza respectivamente por su permisividad a dichos virus. Su crecimiento se hizo a partir de semillas madre utilizando protocolos estándar de manipulación de cultivo de células.

Tanto para el crecimiento de las células como para la realización de los distintos ensayos se utilizó medio de cultivo MEM (por sus siglas en inglés "Minimum Essential Medium") para la línea HEp-2 y DMEM (por sus siglas en inglés "Dulbecco's Modified Eagle Medium") para la línea A549. Ambos medios fueron suplementados con un 1% de antibióticos (penicilina 100 µg/mL y estreptomycin 100 µg/mL) y un 1% de glutamina (2 mM). Además, dependiendo del propósito de su utilización, se les agregó suero fetal bovino y dependiendo del porcentaje de este en el medio de cultivo los llamaré (D)MEM10%, (D)MEM2% y (D)MEM0%. Las células fueron incubadas en estufa a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> (condiciones estándar de cultivo).

## 5.3 Virus

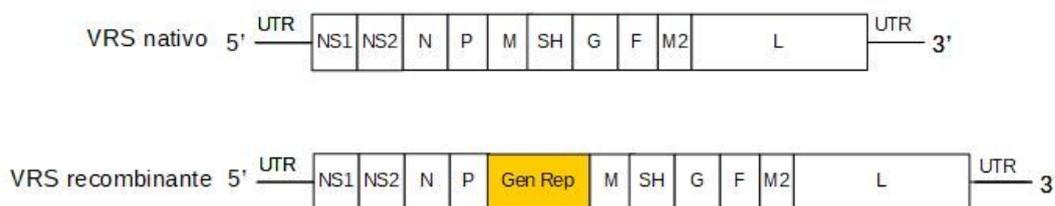
En este trabajo se utilizaron 5 cepas de VRS (94N/230, 98B/701, NH402, NH407 y Long), 2 virus VRS recombinantes portadores de genes reporteros (VRS-GFP y VRS-mcherry) y 1 virus influenza recombinante portador de un gen reportero (Inf-nLuc).

Las 5 cepas virales de VRS fueron caracterizadas a partir de aislados naturales que fueron seleccionadas por presentar diferente antigüedad y genotipo. La cepa Long es la más antigua y aquella utilizada como cepa de referencia de VRS, mientras que el resto de las cepas fueron obtenidas de muestras clínicas tomadas en Montevideo en distintas épocas: 94N/230, 98B/701, NH402 y NH407. Por otro lado, los 2 virus VRS recombinantes portadores de genes reporteros (VRS-mcherry y VRS-GFP) pertenecen a la cepa Long y fueron cedidos por el laboratorio Virpath. Para influenza, los ensayos se realizaron utilizando el virus recombinante Inf-nLuc, perteneciente a la cepa H1N1 y también proporcionado por dicho laboratorio.

La descripción de los virus VRS e influenza recombinantes se detalla a continuación. Las preparaciones de todos los stocks virales fueron realizadas a partir de semillas madre mediante protocolos estándar de crecimiento de virus.

### 5.3.1 VRS-mcherry

El virus recombinante portador del gen reportero mcherry (VRS-mcherry) fue generado a partir de un virus de la cepa Long de VRS por Rameix-Welti *et al.* en 2014. Para ello insertaron el gen que codifica a la proteína fluorescente roja monomérica (mcherry) flanqueada por señales de inicio y terminación de genes de VRS entre los genes P y M del genoma viral (Figura 6). De esta forma, el virus recombinante obtenido genera un ARNm extra, el cual codifica a la proteína reportera. Los plásmidos generados, fueron utilizados para transfectar células BSRT7/5 junto con otros cuatro plásmidos que codifican las proteínas N, P, L y M2-1, utilizadas para promover la transcripción y replicación del virus. Posteriormente los virus recombinantes viables fueron recuperados y testeados.



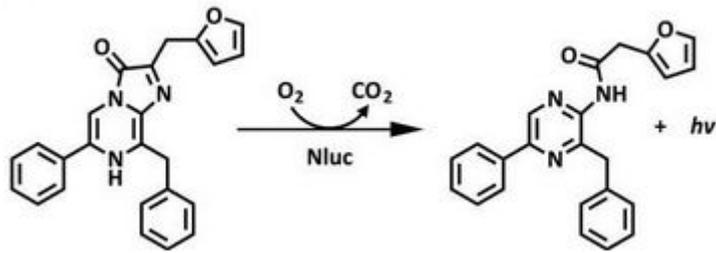
**Figura 6. Constructo de VRS reportero.** El esquema superior representa el genoma nativo de VRS, mientras que el inferior muestra las modificaciones de dicho genoma mediante la adición del gen reportero (Gen Rep) codificante para las proteínas reporteras mcherry/ GFP.

### 5.3.2 VRS-GFP

El virus VRS recombinante portador del gen reportero GFP (“Green fluorescent protein”) fue generado de la misma manera que el virus VRS-mcherry, insertándose el gen codificante para la proteína GFP entre los genes P y M de VRS tal como se ilustra en la Figura 6.

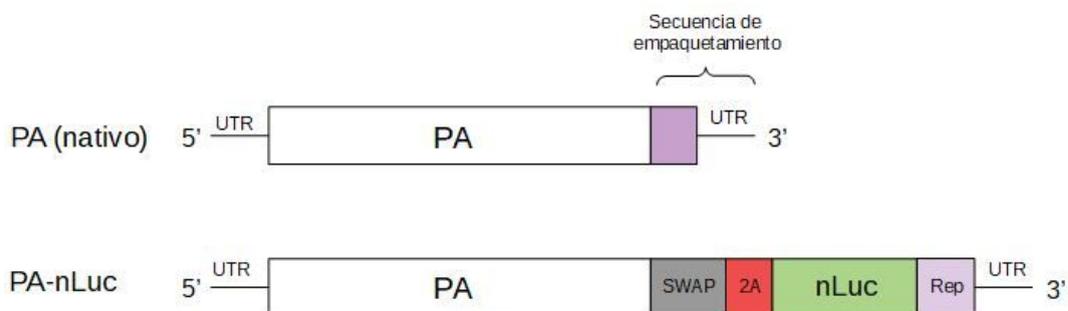
### 5.3.3 Inf-nLuc

El virus Inf-nLuc es un virus influenza recombinante portador de un gen codificante para una nanoproteína de luciferasa. Dicha proteína es la subunidad activa de la enzima y uno de sus sustratos es la Furimazina, compuesto a partir del cual es capaz de generar luz mediante la reacción representada en la Figura 7 (Hall *et al.* 2012).



**Figura 7. Reacción química catalizada por la nano Luciferasa utilizando a la Furimazina como sustrato (Hall *et al.* 2012).**

El virus recombinante Inf-nLuc fue generado en 2013 por Tran *et al.* a partir de un virus perteneciente a la cepa de laboratorio A/WSN/33 (H1N1) y un constructo diseñado por dicho grupo de investigación. La creación de dicho constructo, llamado PA-nLuc, fue realizada mediante la fusión de la secuencia codificante para la nano luciferasa con el extremo 3' del gen PA (Figura 8). Entre las secuencias PA y nLuc se colocó además la secuencia que codifica al péptido 2A “auto-escindible”, lo cual lleva al procesamiento post-traduccional de la proteína PA-nLuc dando lugar a las proteínas PA y nLuc de forma individual. En dicho constructo se agregó también una secuencia de empaquetamiento (Rep) luego del codón de parada de nLuc, la cual está formada por repeticiones de una secuencia de 50 nucleótidos, obtenida a partir de la señal de empaquetamiento nativa. Por otro lado, la señal original presente en el extremo 3' de PA fue bloqueada mediante la introducción de 18 mutaciones silenciosas (SWAP). En conjunto, estas dos últimas modificaciones permiten que el constructo sea empaquetado en el virión como parte del genoma y se evita que el gen nLuc se pierda del virus recombinante.



**Figura 8. Constructo de Inf-nLuc.** El esquema superior representa el segmento nativo del genoma de influenza codificante para la proteína PA, mientras que el esquema inferior representa el constructo generado mediante la inserción de los genes 2A y nLuc, la generación de mutaciones en la señal de empaquetamiento nativa (SWAP) y la introducción de los repetidos terminales corriente abajo del gen de nLuc (Rep).

## 5.4 Titulación de las cepas de VRS en células HEp-2

Para las titulaciones, monocapas confluentes de células HEp-2 crecidas en placas de 96 pocillos en medio MEM10% fueron inoculadas con el virus en diluciones seriadas en base 10 preparadas con medio MEM0% (50  $\mu$ L/ pocillo), partiendo desde el virus puro y hasta la dilución  $10^{-13}$ . Cada dilución fue inoculada por sextuplicado y paralelamente fue incluido un control negativo (células no infectadas). Luego de la etapa de adsorción viral durante 1 h a 37 ° C en estufa con saturación de CO<sub>2</sub> al 5%, el inóculo fue retirado y se agregaron 200  $\mu$ L de MEM2% por pocillo. La placa se incubó en condiciones estándar de cultivo hasta el día 7 en el cual se determinó la cantidad de pocillos infectados de cada dilución mediante la visualización del efecto citopático del virus (formación de sincitios) o del desprendimiento de células de la monocapa en un microscopio óptico.

La cantidad de pocillos con efecto citopático y desprendimiento de la monocapa (generado por la infección en cada dilución viral) fue utilizada para calcular la DI50% (dilución del virus capaz de infectar el 50% de los cultivos celulares inoculados) y la DICC50% (dosis infectantes del 50% de cultivos celulares presentes en un inóculo del stock viral) mediante el análisis estadístico de Reed y Muench. El ensayo de titulación se realizó por triplicado para cada cepa del virus y se promediaron los valores de DICC50% calculados.

## 5.5 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y G2 en células HEp-2

La citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a los grupos G1 y G2 sobre células HEp-2 fue evaluada mediante el Método de Rojo Neutro.

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad, monocapas confluentes de células HEp-2 crecidas en placas de 96 pocillos en medio MEM10% fueron incubadas con distintas diluciones de las moléculas preparadas con medio MEM0% suplementado con 1% de DMSO.

Tanto para G1 como para G2 se realizaron *screenings* de citotoxicidad utilizando diluciones al  $\frac{1}{2}$  y abarcando concentraciones de entre 100 y 12,5  $\mu$ M. Para G1 se ajustó además el rango de concentración utilizado, pasando a usarse diluciones al  $\frac{3}{4}$  y abarcando concentraciones de entre 375 y 16  $\mu$ M. Se analizó también la citotoxicidad de la Ribavirina, ya que esta se utilizaría como control positivo en los ensayos de actividad antiviral de las moléculas contra VRS (al ser uno de los fármacos aprobados por la FDA contra dicho virus). Los ensayos de citotoxicidad de la Ribavirina fueron realizados utilizando diluciones al  $\frac{1}{2}$  de dicha droga y abarcando concentraciones de entre 40 y 0,04  $\mu$ M.

Cada dilución fue inoculada por triplicado con un volumen final de 100  $\mu$ L por pocillo. Paralelamente fueron incluidos controles celulares, los cuales fueron tratados únicamente con el medio utilizado para diluir las moléculas. Luego de una incubación por 72 h a 37 ° C en estufa con saturación de CO<sub>2</sub> al 5%, se retiró el sobrenadante y se expuso a las células a una solución de rojo neutro (0,04 mg/mL) y se dejó incubar por 2 h en las mismas condiciones. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se utilizó una solución de

extracción (30% etanol y 1% ácido acético glacial) para extraer el colorante del interior de las células viables. Para ello se colocaron 200  $\mu$ L de solución de extracción por pocillo, se dejaron incubar por 15 minutos en un agitador y se recolectaron los sobrenadantes para hacer una cuantificación del colorante extraído mediante medidas de absorbancia a 540 nm. Paralelamente se hizo un blanco para las medidas de absorbancia, en el cual no se expuso a las células al rojo neutro. Los ensayos de citotoxicidad fueron hechos por triplicado para G1 y por duplicado para el *screening* de G2.

Para las moléculas pertenecientes a G1 se graficaron los porcentajes de viabilidad celular respecto al control no tratado vs log (concentración de las moléculas) utilizando el algoritmo de ajuste de regresión no lineal de pendiente variable (cuatro parámetros) integrado en el software Prism 5. A partir de dicho análisis se obtuvo también la CC50% (concentración citotóxica 50%). Además, tanto para los compuestos pertenecientes a G1 como G2 y para la Ribavirina se obtuvo la MCNC (máxima concentración no citotóxica).

## **5.6 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra VRS en células HEp-2**

La actividad antiviral de las moléculas pertenecientes al grupo G1 contra VRS fue cuantificada mediante dos metodologías. Por un lado, se hicieron ensayos utilizando el virus recombinante VRS-mcherry, en cuyo caso las medidas de actividad antiviral se infirieron de los valores de fluorescencia generados por la proteína reportera mcherry presente en los cultivos celulares luego de tratadas las células con las moléculas. Por otro lado, se utilizó la técnica de RT-qPCR para cuantificar la cantidad de ARN genómico viral correspondiente al gen F presente en los cultivos celulares infectados con el virus VRS-GFP e incubados bajo distintas condiciones de tratamiento, con el fin de determinar la actividad antiviral de las moléculas contra dicho virus.

### **5.6.1 Ensayo de fluorescencia con el virus reportero VRS-mcherry**

Para la realización de dicho ensayo, monocapas confluentes de células HEp-2 crecidas en placas de 96 pocillos en medio MEM10% fueron inoculadas con el virus VRS-mcherry en dos diluciones del stock preparadas con medio MEM0% (200  $\mu$ L/ pocillo). Las MOIs (del inglés "Multiplicity of infection") utilizadas fueron de 2 y 0,5. Luego de la adsorción viral durante 2 h a 37 °C en estufa con saturación de CO<sub>2</sub> al 5%, el inóculo fue retirado y se agregaron 200  $\mu$ L de MEM2% conteniendo distintas concentraciones de las moléculas a analizar (50, 10, 2 y 0,4  $\mu$ M). Además, se incluyó un control de actividad antiviral mediante la utilización de Ribavirina en concentraciones de 16 y 1,6  $\mu$ M. Cada condición fue probada por duplicado en cada placa y se hicieron dos réplicas, obteniendo un total de 4 pocillos por condición. Las placas se incubaron en condiciones estándar de cultivo por 72 h momento en el cual se retiró el sobrenadante, se agregaron 100  $\mu$ L de PBS y se hicieron las medidas de fluorescencia. Para ello se utilizó un lector de placa multimodal Spark (TECAN), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 580 y 635 nm respectivamente.

### **5.6.2 RT-qPCR de infección con VRS-GFP**

Con el fin de evaluar la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra VRS mediante otra metodología, se procedió a hacer una RT-qPCR a partir de cultivos infectados con el virus VRS-GFP y tratados con las moléculas, con el fin de conocer la cantidad de ARN genómico viral producido en los cultivos celulares en las distintas condiciones de estudio.

Para ello, monocapas confluentes de células HEp-2 crecidas en placas de 96 pocillos en medio MEM10% fueron inoculadas con el virus VRS-GFP en dos diluciones del stock preparadas con medio MEM0% (200  $\mu$ L/ pocillo). Las MOIs utilizadas fueron de 0,2 y 0,1. Luego de la adsorción viral durante 1,5 h a 37 °C en estufa con saturación de CO<sub>2</sub> al 5% el inóculo fue retirado y se agregaron 200  $\mu$ L de MEM2% conteniendo las distintas moléculas en una concentración de 10  $\mu$ M. Cada condición fue probada por triplicado. Las placas se incubaron en condiciones estándar de cultivo por 72 h, momento en el cual se recuperó el sobrenadante de cada pocillo. Dichos sobrenadantes fueron analizados por el técnico del laboratorio VirPath, quien les realizó una extracción de ARN total y les cuantificó el ARN genómico viral mediante la amplificación del gen F utilizando un protocolo de RTq-PCR de rutina.

### **5.7 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza en células A549**

Con el fin de evaluar la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza, monocapas confluentes de células A549 crecidas en placas de 96 pocillos en medio DMEM10% fueron inoculadas con una dilución del virus Inf-nLuc preparada con medio DMEM0% (200  $\mu$ L/ pocillo), en una MOI de 3. Luego de la adsorción viral durante 1 h a 37 °C en estufa con saturación de CO<sub>2</sub> al 5%, el inóculo fue retirado y se agregaron 200  $\mu$ L de DMEM2% conteniendo distintas concentraciones de las moléculas a analizar (50, 10, 2, 1, 0,4 y 0,1  $\mu$ M). Además, se utilizó el Oseltamivir como control de actividad antiviral en concentraciones de 0,1 y 0,02  $\mu$ M. Cada condición fue probada por triplicado. Las placas se incubaron en condiciones estándar de cultivo por 48 h, momento en el cual se hizo el revelado. Para hacerlo, se transfirieron 50  $\mu$ L de sobrenadante a placas negras de lectura y se agregaron 25  $\mu$ L de solución de revelado (Nano-Glo® Luciferase Assay System de Promega) el cual contiene un buffer de lisis y el sustrato de la luciferasa. Se dejó incubar por 10 min y posteriormente se tomaron las medidas de luminiscencia en el TCAN.

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1 Titulación de las cepas de VRS en células HEp-2

Para poder realizar ensayos de actividad antiviral y ensayos que involucren la utilización de virus en general, es necesario conocer la concentración de virus que presentan los stocks virales, de modo de poder calcular la concentración de los inóculos utilizados para la infección de los cultivos celulares. Como no siempre es posible realizar ensayos que permitan cuantificar la cantidad de virus infecciosos presentes en los stocks virales, se suelen utilizar ensayos de titulación que nos dan información acerca de la concentración viral, pero que son medidas relativas al ensayo. Uno de los ensayos de titulación más utilizados es el DICC50% (o TCID50), en el cual la forma de expresar la concentración de virus está dada en base a la cantidad de dosis infectantes del 50% de los cultivos celulares presentes en un inóculo del stock viral. Este tipo de titulación fue la elegida en este trabajo para estimar la cantidad de virus infecciosos presentes en los stocks virales de las cepas de VRS (94N/230, 98B/701, NH402, NH407 y Long), ya que los stocks de virus reporteros (tanto de VRS como de influenza) habían sido previamente titulados en el Laboratorio VirPath. De esta forma, la estimación de la concentración viral de los stocks de las cepas de VRS se realizó mediante el cálculo del título viral DICC50% (dosis infectantes del 50% de cultivos celulares), mediante el método de Reed & Muench.

Para ello, a partir de los datos de la cantidad de pocillos infectados (pocillos con efecto citopático observable al microscopio óptico o con desprendimiento de la monocapa celular) por dilución del virus se calculó la DI50%, es decir, la dilución del virus que infecta al 50% de los cultivos celulares inoculados. Posteriormente se obtuvo la DICC50%, la cual representa la cantidad de dosis infectantes del 50% de cultivos celulares presente en un inóculo del stock viral. Por último, se calculó el título viral, el cual está definido como la cantidad de dosis infectantes 50% presentes en 1 mL del stock viral (DICC50%/mL). Todos los valores mencionados se encuentran a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1. Datos de DI50%, DICC50% y DICC50%/mL para las 5 cepas de VRS tituladas.**

Cepas de VRS	DI50%	DICC50%	DICC50%/mL
Long	$10^{-7,6}$	$10^{7,6}$	$10^{9,5}$
94N/203	$10^{-10,2}$	$10^{10,2}$	$10^{12,5}$
98B/701	$10^{-6,1}$	$10^{6,1}$	$10^{8,3}$
NH402	$10^{-7,3}$	$10^{7,3}$	$10^{9,6}$
NH407	$10^{-6,2}$	$10^{6,2}$	$10^{9,5}$

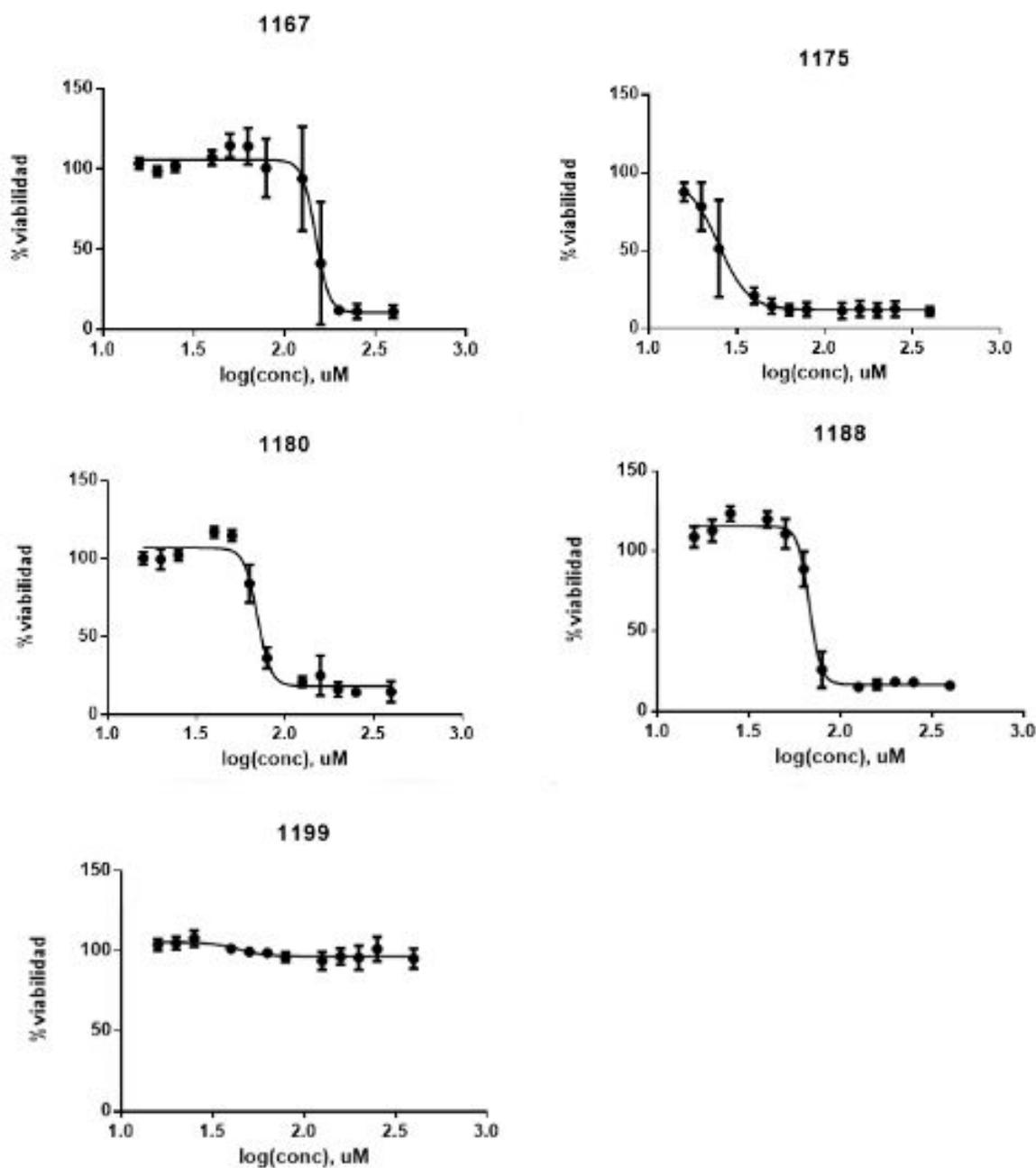
## **6.2 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y G2 en células HEP-2**

Además de la titulación viral, para poder hacer ensayos de actividad antiviral es necesario saber el rango de concentración en que las moléculas en estudio pueden ser utilizadas. Como la replicación viral depende no solo del inóculo que se haga del virus sino también de la cantidad y viabilidad de las células del cultivo, se deben utilizar concentraciones de las moléculas que no alteren dichas condiciones. Esto se debe a que en caso de utilizar concentraciones citotóxicas de las moléculas, es decir concentraciones que disminuyen la cantidad de células viables, ver una disminución en la cantidad de virus al ser tratadas las células con las moléculas podría deberse meramente a una menor capacidad de replicación del virus por falta de células y no por una actividad antiviral generada por el compuesto.

Dado que en el laboratorio de VirPath ya se habían realizado ensayos de citotoxicidad de las moléculas en estudio sobre células A549, en este trabajo no se hicieron dichos ensayos. Además, los resultados obtenidos a raíz de estos fueron utilizados para definir el rango de concentración de las moléculas a ser evaluado en la línea HEP-2 para los ensayos de citotoxicidad en dichas células y también para determinar el rango de concentración en el cual utilizar las moléculas contra el virus influenza en los ensayos de actividad antiviral (ver resultados de citotoxicidad de G1 y Oseltamivir en A549 en Tabla 4 del anexo).

Como se mencionó anteriormente, para las moléculas pertenecientes a los grupos G1 y G2 y para la Ribavirina se hicieron ensayos de citotoxicidad en células HEP-2 mediante el Método de Rojo Neutro.

En el caso de G1, a partir de los resultados obtenidos se procedió a realizar gráficos de porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración utilizada de las moléculas. Para ello se hizo un ajuste no lineal en el programa informático GraphPad Prism 5. Los resultados se muestran en la Figura 9.



**Figura 9. Gráficos de citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 sobre células HEp-2 en función del tratamiento.** Viabilidad celular de los cultivos de células HEp-2 al ser expuestos a las moléculas pertenecientes al grupo G1 en diferentes concentraciones respecto a un control de células no tratadas.

A partir de dichos ajustes se obtuvo la CC50%, es decir, la concentración de la molécula en estudio que reduce la viabilidad celular en un 50% respecto a un control no tratado. Además, a partir de los resultados de citotoxicidad se determinó la MCNC de los compuestos, siendo esta la máxima concentración utilizada de cada molécula que da lugar a un porcentaje de viabilidad celular de al menos un 95% respecto al control no tratado. Dichos valores se muestran a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2. Valores de CC50% y MCNC de las moléculas pertenecientes a G1 y de la Ribavirina en células HEp-2.**

Molécula	CC50% ( $\mu\text{M}$ )	MCNC ( $\mu\text{M}$ )
1167	149	89
1175	25	<16
1180	70	50
1188	68	50
1199	-	375
Ribavirina	-	20

Como se puede observar en la Tabla 2, las concentraciones utilizadas de las moléculas 1167, 1175, 1180 y 1188 permitieron obtener gráficos en los cuales se ve claramente la curva sigmoidea generada por la relación dosis-respuesta. En estos casos, como el rango de concentraciones nos permite ver el decaimiento de la viabilidad celular prácticamente desde el 100 al 0%, al realizar el ajuste es posible extrapolar la concentración de la molécula que disminuye la viabilidad celular en un 50% y así obtener la CC50%. De esta forma se obtuvieron valores de CC50% de 149, 25, 70 y 68  $\mu\text{M}$  respectivamente. Por el contrario, para la molécula 1199 no logramos abarcar un rango de concentración que permitiera ver el decaimiento de la viabilidad celular y por lo tanto al realizar el ajuste e inferir la CC50% obtuvimos un valor teórico que carece de sentido. Así, la viabilidad de los cultivos prácticamente no se ve afectada por la exposición de las células al compuesto 1199 en el rango de concentración utilizado (375 a 16  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, la CC50% obtenida es 44  $\mu\text{M}$ . Por esta razón la citotoxicidad de este compuesto será evaluada únicamente en base a la MCNC utilizada obtenida, la cual es de 375  $\mu\text{M}$ .

Por otro lado, y en cuanto al grupo G2, al ser muchas las moléculas a analizar se utilizaron menos diluciones de cada una de ellas para hacer el ensayo de citotoxicidad, lo cual en general da lugar a que no se logre obtener la curva sigmoidea de citotoxicidad. De esta forma se clasificó a las moléculas en función de la MCNC utilizada. En el caso de las moléculas que aún en la concentración más baja utilizada generaron una viabilidad menor al 95% se expresó la MCNC utilizada como <12,5  $\mu\text{M}$ . A continuación, en la Tabla 3, se encuentran dichos resultados para cada uno de los 65 compuestos analizados pertenecientes a G2.

**Tabla 3. Moléculas pertenecientes a G2 clasificadas en función de su MCNC.** En la tabla se muestra el nombre de las moléculas (ej. 272, 875, etc) agrupadas en función de su MCNC (ej. <12,5  $\mu\text{M}$ ).

MCNC ( $\mu\text{M}$ )	< 12,5	12,5	25	50	100
	272	875	655	716	783
	1254	723	152	894	123
	1137	728	872	306	270
	1267	297	1269	288	1185
	221	124	274	692	1132
	143	187	1266	307	1118
	272	875	148	810	784
		281	658	109	273
		609	881	731	120
<b>Molécula</b>			1268	1265	1270
			151	913	791
			655	789	690
			263	1138	313
				327	248
				716	684
				788	781
				175	783
					1098
					127

Como se puede observar en la Tabla 3, la MCNC de las moléculas es bastante variable, sin embargo, la mayoría de los compuestos presentan valores iguales o mayores a 50  $\mu\text{M}$ , valor que predomina también para el grupo G1.

En cuanto a los experimentos de citotoxicidad realizados con la Ribavirina, a excepción de la concentración 40  $\mu\text{M}$ , la cual redujo en un 30% la viabilidad celular, el resto de concentraciones (de 20 a 0,04  $\mu\text{M}$ ) dieron lugar a valores de viabilidad de aproximadamente el 100%. Dado que con las concentraciones utilizadas de Ribavirina no se llegó a reducir la viabilidad celular a valores menores del 70%, se reportó únicamente la citotoxicidad en base a la MCNC de dicha droga, la cual fue 20  $\mu\text{M}$  (Tabla 2).

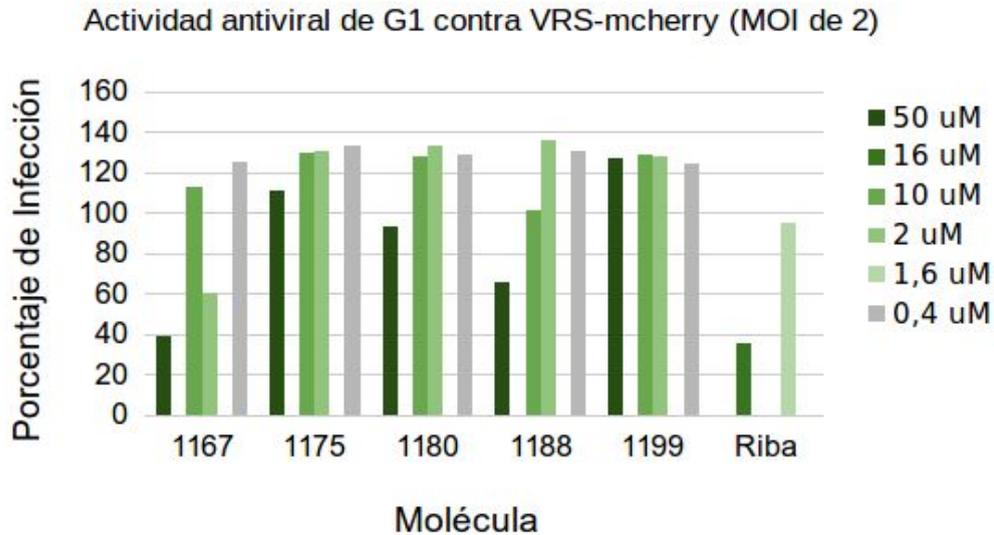
Tomando en consideración los resultados de citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y también los resultados de la Ribavirina sobre la línea celular HEP-2, se determinó la concentración máxima de las moléculas a ser utilizada en los ensayos de actividad antiviral. De esta forma, en los siguientes ensayos, las moléculas pertenecientes a G1 fueron utilizadas en concentraciones iguales o menores a 50  $\mu\text{M}$ , mientras que la Ribavirina fue utilizada en una concentración máxima de 16  $\mu\text{M}$ .

### **6.3 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra VRS en células HEp-2**

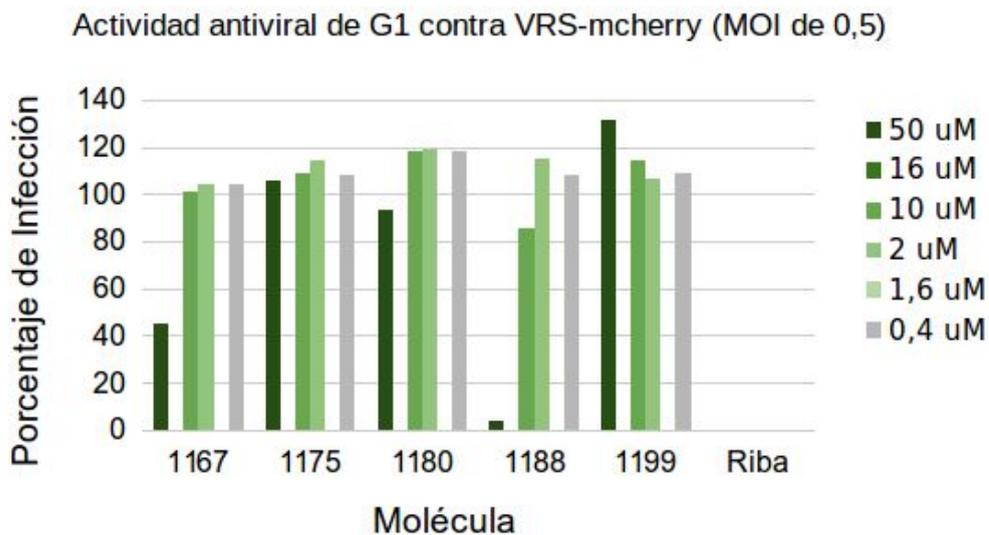
La actividad antiviral de un compuesto, tal como indica su nombre, es la capacidad que tiene dicho compuesto de inhibir el ciclo de replicación viral. Dicha actividad puede ser cuantificada de diversas maneras, siendo posible en algunos casos determinar la cantidad de virus infecciosos presentes en los cultivos celulares luego de tratados con los compuestos. En otros casos se utiliza la medida de algún componente viral, ya sea ARN, ADN o producción de proteínas específicas, para inferir la cantidad de virus presente en los cultivos. En este trabajo se optó por realizar los ensayos de actividad antiviral de esta última manera y se utilizaron dos aproximaciones para el virus VRS: 1) Utilización del virus recombinante VRS-mcherry y medidas de fluorescencia para cuantificar la producción de la proteína reportera mcherry; 2) Cuantificación de ARN genómico viral en infecciones generadas con el virus VRS-GFP mediante RT-qPCR.

#### **6.3.1 Ensayo de fluorescencia con el virus reportero VRS-mcherry**

En este ensayo se utilizaron las medidas de fluorescencia para cuantificar la producción de la proteína reportera mcherry generada por el virus recombinante y así inferir los niveles de infección de los cultivos celulares. De esta forma, a partir de las medidas de fluorescencia de los cultivos infectados y tratados con las distintas concentraciones de moléculas, se hicieron gráficos de porcentaje de infección (respecto a un control de infección sin tratamiento) en función de la concentración de las moléculas utilizada. En la Figura 10 se muestran los gráficos correspondientes a los ensayos en los cuales se utilizó una MOI de 2 para infectar los cultivos, mientras que en la Figura 11 se encuentran aquellos en los cuales se utilizó una MOI de 0,5.



**Figura 10. Actividad antiviral de las moléculas de G1 contra VRS inferida a partir de valores de fluorescencia.** Nivel de infección de los cultivos celulares infectados con VRS-mcherry (MOI de 2) luego de su tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (en concentraciones 50, 10, 2 y 0,4  $\mu$ M) y al tratamiento con Ribavirina (en concentraciones 16 y 1,6  $\mu$ M) respecto al control no tratado.



**Figura 11. Actividad antiviral de las moléculas de G1 contra VRS inferida a partir de valores de fluorescencia.** Nivel de infección de los cultivos celulares infectados con VRS-mcherry (MOI de 0,5) luego de su tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (en concentraciones 50, 10, 2 y 0,4  $\mu$ M) y al tratamiento con Ribavirina (en concentraciones 16 y 1,6  $\mu$ M) respecto al control no tratado.

La cantidad de fluorescencia detectada en los cultivos celulares infectados con el virus VRS-mcherry es proporcional a la cantidad de proteína fluorescente presente en los cultivos. Además, como la producción de dicha proteína es indicador de la replicación del virus reportero, es posible inferir la actividad antiviral de los compuestos en estudio a través de los valores de fluorescencia detectados.

Como se puede observar en los gráficos de las Figuras 10 y 11, de las cinco moléculas en estudio, dos de ellas (1167 y 1188) reducen notablemente los valores de fluorescencia de los cultivos y por lo tanto es posible que presenten actividad antiviral contra VRS.

A concentraciones de 0,4, 2 y 10  $\mu\text{M}$  ninguna de las moléculas pertenecientes a G1 genera una disminución significativa en los niveles de fluorescencia, sin embargo, a 50  $\mu\text{M}$  las moléculas 1167 y 1188 si logran disminuir dicha medida en forma notoria, tanto al inocular los cultivos con una MOI de 2 como con una MOI de 0,5. En el caso de la molécula 1167, al ser utilizada en una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , disminuye un 60% la fluorescencia, tanto al inocular el cultivo con la MOI de 2 como de 0,5. Por otro lado, la molécula 1188, presenta diferencias dependiendo de la concentración viral del inóculo, siendo la reducción de un 40% al utilizar la MOI de 2 y llegando casi a un 100% al ser la MOI de 0,5.

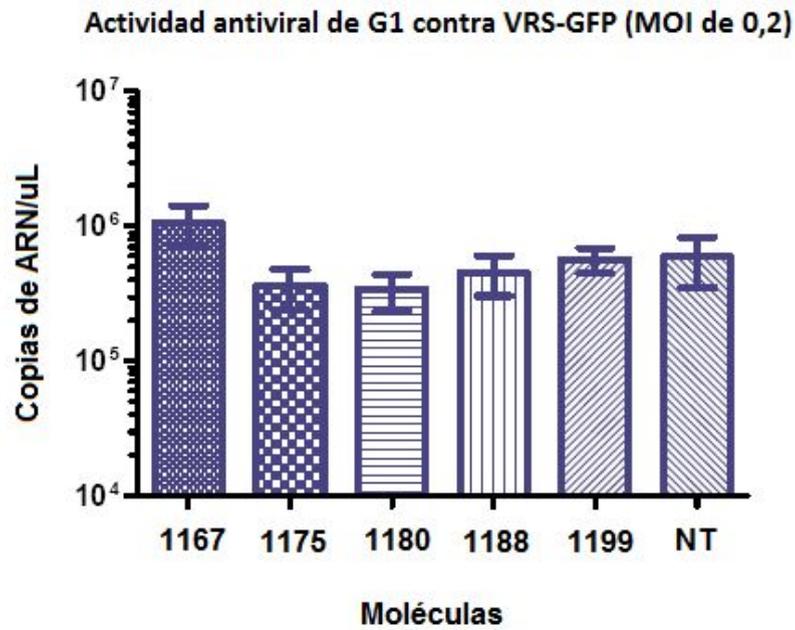
En cuanto a la Ribavirina, esta presenta actividad antiviral al ser utilizada en concentraciones menores respecto a las moléculas en estudio. De esta forma, al ser aplicada en una concentración de 16  $\mu\text{M}$  genera un 60% de reducción en la carga viral de VRS en cultivos infectados con la MOI de 2, y un 100% de reducción al utilizar la MOI de 0,5. Además, la Ribavirina utilizada en concentración 1,6  $\mu\text{M}$  como tratamiento para los cultivos infectados con la MOI de 0,5 también genera aproximadamente un 100% de reducción de la infección por VRS.

### **6.3.2 Ensayo de RT-qPCR con el virus reportero VRS-GFP**

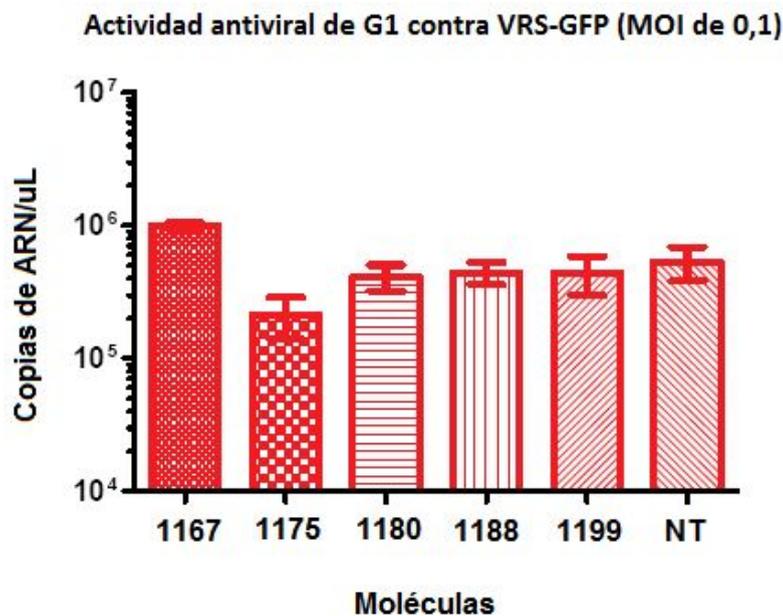
Como segunda aproximación para la evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra VRS se hicieron RT-qPCRs sobre los sobrenadantes de cultivos infectados con el virus VRS-GFP y tratados con dichas moléculas. De esta forma, a partir de los ensayos de RT-qPCR se obtuvo el número de copias de ARN genómico viral correspondiente al gen F presente en los cultivos celulares bajo cada condición.

Al igual que con las medidas de fluorescencia, la cantidad de copias de ARN genómico viral presente en los cultivos celulares infectados puede ser utilizado para determinar la capacidad replicativa del virus en las distintas condiciones, y por lo tanto es posible inferir la posible actividad antiviral de los compuestos en estudio mediante esta metodología.

La cantidad de copias de ARN viral por microlitro de muestra obtenidos en los cultivos infectados con VRS-GFP luego de tratados con las moléculas fue graficada en función de la molécula utilizada para el tratamiento. En las Figuras 12 y 13 se pueden observar los resultados presentados en forma gráfica. Dichas figuras corresponden a ensayos en los cuales se utilizaron MOIs de 0,2 y 0,1 respectivamente.



**Figura 12. Medidas de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 por RT-qPCR contra VRS.** Cantidad de copias de ARN codificantes para la proteína F viral presentes en los cultivos infectados con el virus VRS-GFP en función del tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (a una concentración de 10 μM) y para un cultivo no tratado (NT), al ser utilizada la MOI de 0,2.



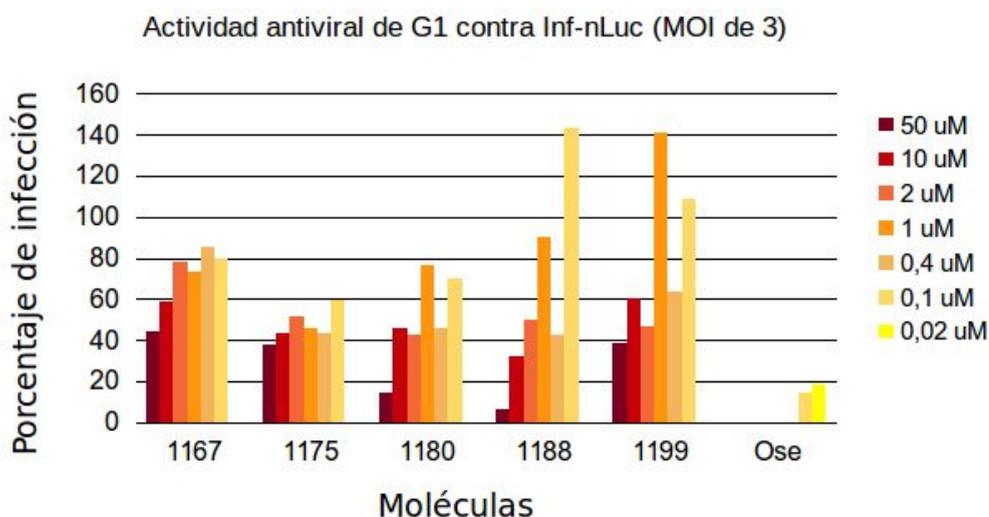
**Figura 13. Medidas de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 por RT-qPCR contra VRS.** Cantidad de copias de ARN codificantes para la proteína F viral presentes en los cultivos infectados con el virus VRS-GFP en función del tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (a una concentración de 10 μM) y para un cultivo no tratado (NT), al ser utilizada la MOI de 0,1.

Como se puede ver en las Figuras 12 y 13, las moléculas pertenecientes al grupo G1 no parecerían reducir los niveles de infección de los cultivos celulares en las condiciones analizadas. La única molécula que podría desviarse de este comportamiento es la 1175, ya que en la infección generada con la MOI de 0,1 dicha molécula genera una leve disminución en la cantidad de copias de ARN respecto al control.

#### 6.4 Evaluación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza en células A549

La actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra influenza fue evaluada mediante la utilización del virus reportero Inf-nLuc. Utilizando dicho virus es posible determinar el nivel de replicación viral en cultivos celulares, ya que los niveles de luminiscencia generados al exponer los cultivos al sustrato de la enzima son proporcionales a la cantidad de Luciferasa presente en los cultivos y también a la tasa de replicación del virus.

De esta forma, los valores de luminiscencia obtenidos en el ensayo fueron utilizados para graficar los porcentajes de infección de los cultivos tratados (respecto a infecciones no tratadas) en función de la concentración utilizada de las moléculas. Dicho gráfico se presenta a continuación en la Figura 14.



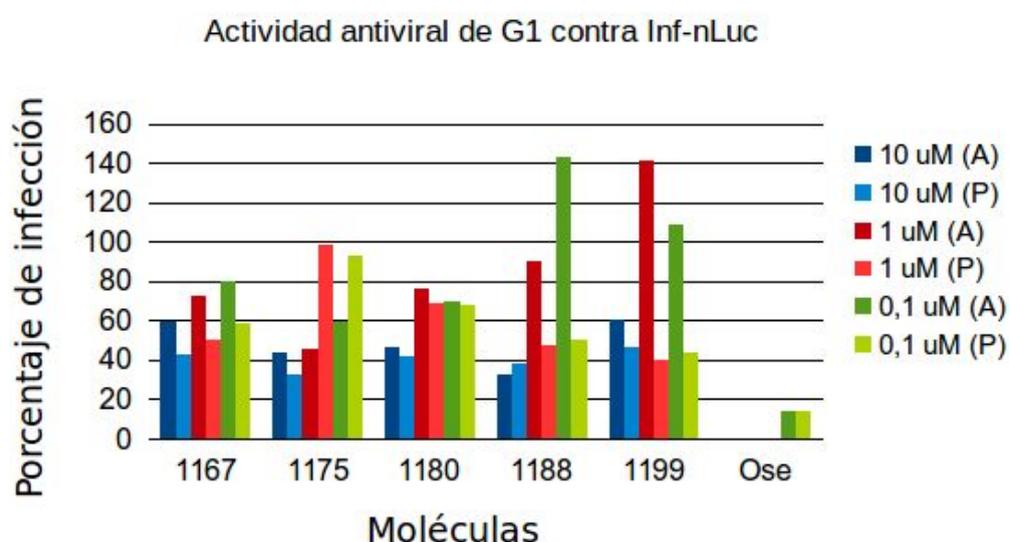
**Figura 14. Actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra Influenza medida por luminiscencia.** Cuantificación del nivel de infección de los cultivos celulares infectados con Inf-nLuc (con una MOI de 3) luego de su tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (en concentraciones 50, 10, 2, 1, 0,4 y 0,1  $\mu$ M) y al tratamiento con Osetamivir (en concentraciones 0,1 y 0,02  $\mu$ M).

Como se puede observar en la Figura 14, todas las moléculas del grupo G1 parecerían tener actividad antiviral contra el virus influenza, al menos en algunas de las concentraciones utilizadas de las moléculas. Así, la 1167 disminuye los niveles de infección entre un 60 y 20% en el rango de concentración analizado, la 1175 entre un 60 y un 40%, la 1180 entre un 85 y 25%, la 1188 entre un 95 y un 0%, y la 1199 entre un 60 y un 0%. El efecto antiviral más evidente se puede observar al utilizar la concentración 50  $\mu\text{M}$  de las moléculas, dando lugar a reducciones de los niveles de infección de entre un 60 y un 95%.

En el gráfico también se puede ver que al utilizar una concentración 0,4  $\mu\text{M}$  de las moléculas 1180, 1188 y 1199 los porcentajes de infección son bastante menores que al utilizar las moléculas en la concentración inmediatamente mayor y menor (1 y 0,1  $\mu\text{M}$  respectivamente). Dado que la actividad antiviral esperada de los compuestos debería seguir una curva sigmoidea, la interpretación de estos resultados podría a priori inferir posibles variaciones en la manipulación a la hora de hacer el ensayo, habiéndose realizado inóculos del virus menores a los deseados o quizás habiendo utilizado menos buffer de revelado del debido (esto no ha podido ser demostrado). Por otro lado, una explicación alternativa podría considerar que el efecto antiviral observado no sea debido (al menos exclusivamente) a una actividad de la molécula directamente sobre el virus sino sobre algún factor celular implicado en el ciclo de replicación viral. Esta hipótesis amerita una exploración más profunda, que está más allá de los objetivos de esta tesina. De todas maneras, exceptuando estos puntos los gráficos muestran una tendencia de decaimiento de la infección al aumentar la dosis de tratamiento, con lo cual aún en presencia de estos puntos incongruentes podría inferirse una posible actividad antiviral por parte de las moléculas 1180, 1188 y 1199 contra el virus Inf-nLuc.

En cuanto al control positivo de actividad antiviral realizado con Oseltamivir, se puede observar cómo dicho compuesto presenta actividad antiviral a ambas concentraciones utilizadas. De esta manera, tanto a concentraciones de 0,1 como 0,02  $\mu\text{M}$  el Oseltamivir reduce aproximadamente un 80% la infección viral.

Como se mencionó anteriormente, ensayos similares de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza habían sido realizados en el laboratorio de VirPath y fueron utilizados como antecedentes. En dicha instancia se utilizó también el virus recombinante Inf-nLuc con una MOI de 0,1 y un rango de concentraciones de entre 10 y 0,001  $\mu\text{M}$ . Los resultados de dichos ensayos se encuentran en la Figura 16 dentro del anexo, mientras que en la Figura 15 se presenta un gráfico en el cual se compararon los niveles de infección obtenidos en este trabajo con aquellos obtenidos en los ensayos utilizados como antecedentes.



**Figura 15. Comparación de la actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra Influenza obtenidas en este trabajo con aquellas obtenidas en los antecedentes.** Cuantificación del nivel de infección de los cultivos celulares infectados con Inf-nLuc luego de su tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (en concentraciones 10, 1 y 0,1  $\mu\text{M}$ ) y al tratamiento con Oseltamivir (en concentraciones 0,1  $\mu\text{M}$ ), donde (A) representa las medidas obtenidas en este trabajo en el cual se utilizó una MOI de 3 y (P) representa las medidas obtenidas en ensayos previos en los cuales se utilizó una MOI de 0,1.

En la Figura 15 se pueden comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados previos utilizados como antecedentes. Por un lado, para la molécula 1167 la tendencia obtenida al tratar los cultivos con distintas diluciones de las moléculas es la misma, sin embargo, en este trabajo se obtuvieron porcentajes de infección mayores que en los antecedentes (aproximadamente un 20% más para cada dilución de la molécula), lo cual era esperable ya que la MOI utilizada en este trabajo fue mucho mayor que aquella utilizada en los ensayos previos (MOI de 3 vs 0,1). En cuanto a la 1175, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  los porcentajes de infección son similares, mientras que a 1 y 0,1  $\mu\text{M}$  se ven algunas diferencias. Para la 1180 y para el Oseltamivir se obtuvieron medidas muy similares en todas las concentraciones analizadas. Por último, para las moléculas 1188 y 1199, las medidas a 10  $\mu\text{M}$  son similares entre ambos ensayos, mientras que para las concentraciones 1 y 0,1  $\mu\text{M}$ , en los ensayos realizados en este trabajo se obtuvieron valores mucho mayores de porcentaje de infección de los cultivos que aquellos obtenidos en ensayos previos. A modo general podría decirse entonces que las moléculas 1167, 1188 y 1199 presentan todas la misma tendencia, presentando mayor actividad antiviral cuanto menor es la MOI utilizada en la infección. Por otro lado, la 1175 parecería generar una respuesta inversa y la 1180 y el Oseltamivir generan el mismo efecto antiviral independientemente del inóculo utilizado.

## 7. DISCUSIÓN

---

Siendo VRS y el virus influenza los agentes virales de mayor impacto en lo que respecta a infecciones respiratorias y dado el bajo repertorio y eficacia de los fármacos actualmente existentes para su tratamiento, resulta imprescindible la búsqueda de nuevas drogas con actividad antiviral y profiláctica, así como de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento.

El presente trabajo formó parte de un proyecto cuyo objetivo fue la búsqueda de moléculas con actividad antiviral contra estos virus respiratorios. Dentro de dicho proyecto se habían realizado ensayos preliminares de evaluación de la citotoxicidad (en células de la línea A549) y actividad antiviral (contra el virus influenza) de un conjunto de moléculas diseñadas a partir de una molécula inicial denominada 28a (Moore *et al.* 2013), para la cual estaba reportada una actividad antiviral contra varios virus respiratorios. A partir de esos resultados, cinco moléculas (1167, 1175, 1180, 1188 y 1199) fueron seleccionadas por su baja citotoxicidad y posible actividad antiviral contra el virus influenza para ser probadas contra VRS.

En los estudios previos de toxicidad celular de las moléculas pertenecientes a G1 en la línea celular A549, se evaluaron concentraciones de entre 100 y 12,5  $\mu\text{M}$ . De esta forma, se observó que las moléculas 1167, 1180, 1188 y 1199 no disminuían la viabilidad de los cultivos de células A549 al ser utilizadas a 50  $\mu\text{M}$ , mientras que la molécula 1175 lo hacía aproximadamente en un 30% a dicha concentración. El Oseltamivir (antiviral aprobado por la FDA para el tratamiento del virus influenza) presenta una actividad antiviral capaz de disminuir los niveles de infección de los cultivos celulares en un 80% al ser utilizado a una concentración no citotóxica de 0,02  $\mu\text{M}$ . Tomando dicha concentración como referencia para el desarrollo de drogas contra el virus influenza, se puede decir que los resultados obtenidos para las moléculas en estudio son prometedores, ya que permiten utilizar grandes rangos de concentración para los ensayos de actividad antiviral contra dicho virus. En conjunto, estos resultados previos dieron lugar a la selección de las moléculas 1167, 1175, 1180, 1188 y 1199 para su estudio en este trabajo.

Teniendo en cuenta que tanto las células A549 como HEP-2 son células humanas inmortalizadas, se decidió utilizar concentraciones de las moléculas similares en los ensayos de citotoxicidad sobre ambas líneas celulares. Además, como para el grupo de moléculas pertenecientes a G1 se buscaba obtener no solo la MCNC sino también la CC50% se utilizó un rango de concentración más grande con el fin de abarcar concentraciones tóxicas de las moléculas y poder hacer así el análisis estadístico que permitiera obtener dicho parámetro.

En cuanto a los niveles de citotoxicidad de las moléculas en células HEP-2, a partir de los ensayos realizados en este trabajo se podría concluir que son relativamente bajos. Dentro del grupo G1 las moléculas 1167, 1180, 1188 y 1199 no afectan la viabilidad celular de la línea HEP-2 al ser utilizadas a 50  $\mu\text{M}$ , presentando una sobrevida del 100% al igual que lo observado para la línea A549. Por otro lado, la molécula 1175 presenta niveles de citotoxicidad mayores, reduciendo un 85% la viabilidad celular al ser utilizada a dicha concentración, lo cual sería una disminución tres veces mayor que aquella generada en la línea A549 (85 vs 30% de disminución de la viabilidad). En el caso de la Ribavirina (antiviral aprobado por la FDA para el tratamiento de VRS), esta reduce la viabilidad celular de los

cultivos en un 30% al ser utilizada a 40  $\mu\text{M}$  y la MCNC fue de 20  $\mu\text{M}$ , concentración a la cual presenta actividad antiviral contra VRS.

Por último, en cuanto a la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes al grupo G2, estas presentaron valores de MCNC bastante grandes también, dado que aproximadamente la mitad de las moléculas presentaron MCNC iguales o mayores a 50  $\mu\text{M}$ , concentración a la cual la Ribavirina es citotóxica. En este marco, los resultados obtenidos parecen prometedores, ya que al ser baja la citotoxicidad de los compuestos es posible utilizarlos en un amplio rango de concentraciones para la evaluación de su actividad antiviral contra el virus VRS.

En conjunto estos resultados de citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 sobre las líneas celulares HEp-2 y A549 nos llevaron a elegir los rangos de concentración de los compuestos a ser utilizados para los ensayos de actividad antiviral contra VRS y reconfirmar los obtenidos para el virus influenza. Para todos los ensayos se utilizaron concentraciones de las moléculas pertenecientes a G1 iguales o menores a 50  $\mu\text{M}$ . Las moléculas del grupo G2 no se ensayaron con los virus reporteros ya que se priorizó el estudio del grupo G1 por ser aquel de mayor potencial antiviral. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad del grupo G2 serán utilizados para la planificación de futuros ensayos.

Para los ensayos de actividad antiviral de las moléculas contra VRS, en el marco de una pasantía en el laboratorio VirPath se utilizaron virus VRS recombinantes portadores de genes reporteros (VRS-mcherry y VRS-GFP) disponibles en dicho laboratorio. Este tipo de virus recombinantes resultan de gran utilidad para la realización de ensayos de actividad antiviral, ya que permiten procesar un número grande de muestras, como también cuantificar con facilidad el virus presente en los cultivos celulares infectados mediante medidas de fluorescencia.

En cuanto a los ensayos de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes al grupo G1, y observando los resultados obtenidos en el ensayo de fluorescencia con el virus reportero VRS-mcherry, únicamente los compuestos 1167 y 1188 mostraron una reducción de los niveles de infección al ser utilizados a 50  $\mu\text{M}$  (no a concentraciones menores). La molécula 1167 redujo en un 60% el nivel de infección de los cultivos celulares infectados tanto con la MOI de 2 como la de 0,5, mientras que la 1188 redujo un 40 y 100% los niveles de infección al ser aplicada en cultivos infectados con la MOI de 2 y de 0,5 respectivamente. La Ribavirina, utilizada como control de inhibición de infecciones de VRS (la cual presenta una EC50% reportada de entre 0,12 y 4  $\mu\text{M}$  (Hruska *et al.* 1980)), logró reducir los niveles de infección aproximadamente en un 100% al ser aplicada sobre los cultivos celulares en una concentración de 16  $\mu\text{M}$ , tanto para las infecciones generadas con la MOI de 2 como la de 0,5. Por otro lado, al ser utilizada en concentración de 1,6  $\mu\text{M}$  presentó actividad antiviral únicamente al utilizar la MOI más chica, reduciendo la infección en un 60%. En conjunto estos resultados hacen de las moléculas 1167 y 1188 dos drogas candidatas atractivas para el tratamiento contra VRS, ya que bajo ciertas condiciones y utilizando concentraciones tan solo tres veces mayores que aquellas de Ribavirina (50 vs 16  $\mu\text{M}$ ) disminuyen los niveles de infección en forma similar a dicho fármaco.

Por otra parte, en los ensayos de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes al grupo G1 a través de la utilización de la metodología de RT-qPCR realizados con el virus VRS-GFP, la molécula 1175 es aquella que podría tener ciertos niveles de actividad antiviral al ser utilizada a una concentración 10  $\mu\text{M}$  sobre cultivos infectados con una MOI de 0,1. Sin embargo, las diferencias entre el control de infección y los ensayos tratados en estas

condiciones no son muy grandes, razón por la cual es necesario realizar otros estudios a fin de comprobar si esta molécula puede ser una candidata para el tratamiento de VRS.

En conjunto, los ensayos de actividad antiviral contra VRS a través de la utilización de estas dos metodologías (fluorescencia y RT-qPCR) nos permitieron observar una posible actividad antiviral de las moléculas 1167 y 1188 al ser utilizadas a una concentración de 50  $\mu$ M. En este trabajo no se llegó a realizar el ensayo de RT-qPCR a dicha concentración, sin embargo podría ser interesante hacerlo a futuro. Dado que en el ensayo de fluorescencia lo que se mide es la cantidad de proteína mcherry generada en los cultivos infectados y que la inhibición en la producción de dicha proteína por acción de las moléculas puede darse a distintos niveles de su síntesis (transcripción, traducción, plegamiento, etc.) o de forma indirecta por la inhibición de la replicación viral, la realización de ensayos de RT-qPCR podría servirnos para ver si estas moléculas reducen la producción de ARN genómico viral en los cultivos celulares tratados o solamente generan diferencias en cuanto a la producción proteica del virus como se vió mediante las medidas de fluorescencia. También podrían realizarse ambos ensayos utilizando el mismo virus reportero (ej. VRS-mcherry) y la misma carga viral para hacer la infección (en este trabajo se utilizó una MOI de 2 y 0,5 para los ensayos de fluorescencia con el virus VRS-mcherry y una MOI de 0,1 y 0,2 para los ensayos de RT-qPCR con el virus VRS-GFP), de forma de poder comparar los efectos observados mediante las dos técnicas bajo las mismas condiciones de trabajo. Además, a pesar de que este tipo de ensayos son de gran utilidad para la realización de *screenings* de actividad antiviral, representan una primera aproximación al estudio de los compuestos. Es por esto que a partir de los resultados obtenidos, podrían seleccionarse las moléculas con posible actividad antiviral y someterlas a un nuevo ensayo en el cual se pueda evidenciar la capacidad antiviral de los compuestos de una forma directa (cuantificación de virus viables), como por ejemplo utilizando ensayos cuya forma de revelado sea a través de titulaciones. Por otro lado, dado que en los dos ensayos de actividad antiviral realizados en esta tesina se utilizaron virus recombinantes, en el futuro se planea usar virus provenientes de aislamientos naturales, con el fin de determinar si estos compuestos son también efectivos para el combate de distintas cepas del virus. Para ello, en este trabajo se propagaron y se obtuvieron los títulos virales de 5 cepas de VRS de distinto genotipo y antigüedad (94N/230, 98B/701, NH402 y NH407 y Long), las cuales habían sido caracterizadas genética y antigénicamente. Estos títulos virales son necesarios tanto para el diseño de los futuros ensayos de actividad antiviral, como para aquellos que nos permitirán obtener una aproximación a los mecanismos que generan dicha actividad, como por ejemplo ensayos de tiempos de adición.

Algunos de los antivirales en desarrollo más prometedores para combatir a VRS son GS-5806, JNJ-53718678 y ALS-008176. Todos ellos han culminado ensayos de experimentación de fase II y para los cuales se ha podido determinar la EC50% (concentración de la molécula que reduce un 50% la infección) y el nivel de interacción con el ciclo viral. El GS5806 impide la entrada del virus a la célula evitando el evento de fusión, presentando una EC50% de 0,43 nM (Mirabelli *et al.* 2018). JNJ-53718678 es también un antiviral que inhibe el evento de fusión con una EC50% de 0,46 nM (Roymans *et al.* 2017), mientras que ALS-008176 es un nucleósido que inhibe la actividad de la polimerasa viral y cuya EC50% es de 0,47  $\mu$ M (Mirabelli *et al.* 2018). Los ensayos de actividad antiviral realizados en este trabajo no nos permitieron hacer análisis de los cuales obtener la EC50% de nuestras moléculas. Sin embargo, es posible estimar dichos valores para nuestros dos compuestos de mayor potencial antiviral (1167 y 1188), siendo las EC50% para ambos de entre 50 y 16  $\mu$ M al usar la MOI de 0,5 de VRS-mcherry.

En cuanto a los ensayos de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes al grupo G1 contra influenza, todas las moléculas redujeron los niveles de infección entre un 60 y un 95% al ser utilizadas a 50  $\mu\text{M}$  contra el virus Inf-nLuc. Además, las moléculas 1167, 1175 y 1180 presentan actividad antiviral en todo el rango de concentración utilizado (50 a 0,1  $\mu\text{M}$ ), reduciendo los niveles de infección en un 20, 40 y 30% respectivamente al ser utilizadas a una concentración 0,1  $\mu\text{M}$ , concentración a la cual el Oseltamivir genera un 85% de reducción viral. Este hecho, las hace drogas candidatas interesantes para ser utilizadas en el combate contra el virus influenza, dado que las concentraciones activas de dichas moléculas están en el mismo orden que aquellas utilizadas de Oseltamivir (antiviral aprobado por la FDA para el tratamiento de influenza, cuya EC50% reportada es de 1,34 nM (Ferraris *et al.* 2005)). En futuros estudios podría evaluarse si estas moléculas son capaces de generar mayores niveles de reducción de la infección al ser utilizadas junto con el Oseltamivir. En conjunto, los resultados de actividad antiviral de las moléculas contra el virus Inf-nLuc permitieron confirmar la actividad antiviral de los cinco compuestos pertenecientes al grupo G1 contra el virus influenza. Además, se pudo observar que dichas moléculas son activas frente a infecciones generadas con inóculos virales mayores que aquellos usados en los antecedentes (MOI de 3 vs MOI de 0,1). Esto resulta atractivo, ya que el hecho de que los compuestos puedan combatir infecciones con mayor carga viral permitiría eventualmente utilizar dichas moléculas como antivirales en etapas más avanzadas de la infección.

Dentro de los antivirales en desarrollo que tienen mayor potencial para combatir el virus influenza, se pueden destacar el Favipiravir, la Nitazoxanida y el Umifenovir. Todos ellos cursan o han cursado ensayos clínicos de fase III. El Favipiravir es una droga inhibidora de la polimerasa viral, el cual presenta actividad antiviral contra cepas de influenza de tipo A, B y C, con una EC50% de entre 0,19 y 22,5  $\mu\text{M}$  (Sleeman *et al.* 2003) dependiendo de la cadena del virus (Furuta *et al.* 2013). La Nitazoxanida, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la maduración de la proteína HA viral y presenta una EC50% de 50  $\mu\text{M}$  (Tilmanis *et al.* 2017; Palomares-Alonso *et al.* 2007). El Umifenovir, el cual actúa mediante la interacción con HA, inhibiendo el proceso de fusión con una EC50% de entre 8 y 18  $\mu\text{M}$  (Titova *et al.* 2018, Leneva *et al.* 2018). Por otro lado, de las moléculas analizadas en este trabajo, cuatro de ellas (1175, 1180, 1188 y 1199) presentan valores estimados de EC50% de 2  $\mu\text{M}$  contra el virus influenza, mientras que la 1167 presenta una EC50% de entre 50 y 10  $\mu\text{M}$ , lo cual resulta altamente prometedor.

Dado que las cinco moléculas pertenecientes a G1 son compuestos de síntesis diseñados a partir de la molécula 28a generada por el laboratorio de Moore *et al.* y dado que su actividad antiviral fue reportada por dicho grupo de investigación, resulta de utilidad comparar las propiedades presentadas por las moléculas en este trabajo con respecto a dicho compuesto. En estudios realizados contra las cepas WSN del virus Influenza y Edmonton de Metapneumovirus, la molécula 28a había reportado valores de EC50% de 0,88 y 0,81  $\mu\text{M}$  respectivamente, valores cercanos a aquellos estimados para algunas de nuestras moléculas contra el virus influenza (2  $\mu\text{M}$ ).

A modo de resumen, la EC50% estimada para VRS de los compuestos 1167 y 1188 se encuentra entre 50 y 16  $\mu\text{M}$ , mientras que la EC50% estimada para influenza es de 2  $\mu\text{M}$  para las moléculas 1175, 1180, 1188 y 1199 y de entre 50 y 10  $\mu\text{M}$  para la 1167. En conjunto estos valores demuestran el potencial que presentan los compuestos pertenecientes a G1 como antivirales para combatir a VRS y al virus influenza, ya que su EC50% se encuentra en el mismo orden de concentraciones que los antivirales utilizados como referencia (Ribavirina y Oseltamivir), como también de otros antivirales que están

cursando hoy en día ensayos clínicos y de la molécula utilizada como precursora (28a) para la síntesis de los compuestos.

Estas moléculas, además de poder dar lugar a antivirales *per se*, podrían ser utilizadas para el desarrollo de compuestos twin (Contreras *et al.* 2008), siendo estos compuestos generados mediante la fusión de los dominios activos de distintas moléculas con actividad antiviral. El diseño de compuestos twin forma parte de una nueva tendencia de desarrollo de antivirales y permite la generación de moléculas con actividad antiviral de amplio espectro (contra varios tipos y cepas virales), que presentan más de un blanco de acción y que por lo tanto presentan una baja capacidad de generación de variantes resistentes del virus. Dado que estas características son aquellas buscadas en toda generación de fármacos, el hecho de haber encontrado varias moléculas con actividad antiviral contra influenza y VRS resulta muy prometedor, ya que nos permitirá re-editarlos para encontrar otros compuestos similares con mayor capacidad antiviral, como también utilizarlas para el diseño de compuestos twin que actúen contra varios virus respiratorios.

En este trabajo, se realizó la puesta a punto de los ensayos de evaluación de citotoxicidad y actividad antiviral de compuestos químicos, lo cual representa el primer paso en la búsqueda de moléculas con actividad antiviral capaces de reducir las infecciones virales, razón por la cual estos sistemas de evaluación representan una gran herramienta para la continuación de los experimentos planificados para este proyecto de investigación. Además, fue posible identificar varios compuestos con actividad antiviral contra dos de los virus respiratorios de mayor impacto en lo que respecta a infecciones respiratorias agudas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- Air, G. M. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses*. **6**, 245-56 (2011).
- Aljabr, W., *et al.* Investigating the Influence of Ribavirin on Human Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis by Using a High-Resolution Transcriptome Sequencing Approach. *J. Virol.* **90**, 4876-4888 (2016).
- American Academy of Pediatrics. Diagnosis and Management of Bronchiolitis. *PEDIATRICS*. **118**, 4 (2006).
- Ampofo, W. K. *et al.* Improving influenza vaccine virus selection: report of a WHO informal consultation held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 14-16 June 2010. *Influenza Other Respi. Viruses*. **6**, 142-152 (2011).
- Arasaratnam, R. ALS-008176 for Respiratory Syncytial Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. **374**, 1391-1392 (2016).
- Bäichi, T. Direct Observation of the Budding and Fusion of an Enveloped Virus by Video Microscopy of Viable Cells. *Signals* **107**, 1689-1695 (1988).
- Barberis, I., Myles, P., Ault, S. K., Bragazzi, N. L., & Martini, M. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. *Journal of preventive medicine and hygiene*. **57**, 115-120 (2016).
- Biere, B., Bauer, B. & Schweiger, B. Differentiation of influenza b virus lineages yamagata and victoria by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1425-1427 (2010).
- Bitko, V. *et al.* Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- $\kappa$ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J. Virol.* **81**, 1786-1795 (2007).
- Bukreyev, A., Yang, L. & Collins, P. L. The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement. *J. Virol.* **86**, 10880-10884 (2012).
- Collins, P. L. & Graham, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *J. Virol.* **82**, 2040-2055 (2008).
- Collins, P. L. & Karron, R. A. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. *Fields Virology 6th Edition*, Knipe DM, Howley PM, eds, pp 1086-1123. Lippincott Williams & Wilkins (2013).
- Contreras, J.M & Sipp, W. Homo and Heterodimer Ligands: the Twin Drug Approach. *The Practice of Medicinal Chemistry, 3th Edition*. Georges, C. ed, pp 380-414. (2008)
- Cox, R. J., Brokstad, K. A. & Ogra, P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol.* **59**, 1-15 (2004).
- Cros, J. F. & Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: Influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* **95**, 3-12 (2003).

- Cseke, G. *et al.* Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1566–1571 (2009).
- De Vincenzo, J. P., *et al.* Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N Engl J Med.* **373**, 2048–2058 (2015).
- DeVincenzo, J.P., *et al.* Oral GS-5806 activity in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med.* **371**, 711– 722 (2014).
- Doms, R. W. & Helenius, A. Quaternary Structure of Influenza Virus Hemagglutinin after Acid Treatment. *J. Virol.* **60**, 833–839 (1986).
- Eisenhut, M. Cerebral involvement in respiratory syncytial virus disease. *Brain Dev.* **29**, 454 (2007).
- El Ramahi, R. & Freifeld, A. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention of Influenza Infection in Oncology Patients. *J. Oncol. Pract.* **15**, 177–184 (2019).
- Elderfield, R. A. *et al.* NB protein does not affect influenza B virus replication in vitro and is not required for replication in or transmission between ferrets. *J. Gen. Virol.* **97**, 593–601 (2016).
- Ferraris, O., Kessler, N., Lina, B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and Oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res.* **68**, 43–8 (2005).
- Fougerolles, A., Zeldin, R. & Moses, E. Results from the first-in-infant Phase I/IIa study with the anti-RSV Nanobody, ALX-0171. *Ablynx* (2016).
- Fu, Y., *et al.* JNJ872 inhibits influenza A virus replication without altering cellular antiviral responses. *Antiviral Research.* **133**, 23–31 (2016).
- Furuta, Y., Gowen, B. B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D. & Barnard, D. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* **100**, 2 (2013).
- Gomez, R. S., Guisle-Marsollier, I., Bohmwald, K., Bueno, S. M. & Kalergis, A. M. Respiratory Syncytial Virus: Pathology, therapeutic drugs and prophylaxis. *Immunol. Lett.* **162**, 237–247 (2014).
- González-Reyes, L. *et al.* Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9859–64 (2001).
- Gottlieb, J. *et al.* ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J. Hear. Lung Transplant.* **35**, 213–221 (2016).
- Graaf, M. & Fouchier, R. A. M. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* **33**, 823–41 (2014).
- Graham, B. S., Modjarrad, K. & McLellan, J. S. Novel antigens for RSV vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **35**, 30–38 (2015).
- Graham, S. B. Vaccines against respiratory syncytial virus: the time has finally come. *Vaccine.* **30**, 3535–3541 (2016).
- Haid, S., Grethe, C., Bankwitz, D., Grunwald, T., & Pietschmann, T. . Identification of a Human Respiratory Syncytial Virus Cell Entry Inhibitor by Using a Novel Lentiviral Pseudotype System. *Journal of virology.* **90**, 3065–3073 (2016).
- Hall, C. B. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *New England Journal of Medicine.* **344**, 1917–1928 (2001).

- Hall, M. P., *et al.* Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS chemical biology*. **7**,1848-57 11 (2012).
- Hashimoto, K., & Hosoya, M. Neutralizing epitopes of RSV and palivizumab resistance in Japan. *Fukushima journal of medical science*. **63**, 127–134 (2017).
- Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* **379**, 913–923 (2018).
- Hendricks, D. A., Mcintosh, K. & Patterson, J. L. Further Characterization of the Soluble Form of the G Glycoprotein of Respiratory Syncytial Virus. *J. Virol.* **62**, 2228–2233 (1988).
- Hershberger, E. *et al.* Safety and efficacy of monoclonal antibody VIS410 in adults with uncomplicated influenza A infection: Results from a randomized, double-blind, phase-2, placebo-controlled study. *E. Bio. Medicine*. **40**, 574-582 (2019).
- Hruska, J. F., Bernstein, J. M., Douglas, R. G. & Hall, C. B. Effects of ribavirin on respiratory syncytial virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **17**, 770-775 (1980).
- <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm#summary>
- <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/respiratory-syncytial-virus-infection-developing-antiviral-drugs-prophylaxis-and-treatment-guidance>
- <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/shionogi-announces-fda-xofluza-baloxavir-treatment-acute-uncomplicated-influenza-0001>
- Jefferson, T. *et al.* Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* . **10**, CD008965 (2014).
- Jin, H. & Chen, Z. Production of live attenuated influenza vaccines against seasonal and potential pandemic influenza viruses. *Current Opinion in Virology*. **6**, 34–39 (2014).
- Jiří, B. *et al.* Safety and Immunogenicity of 3 Formulations of an Investigational Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Nonpregnant Women: Results From 2 Phase 2 Trials. *The Journal of Infectious Diseases*. **217**, 1616–1625 (2018).
- Joseph, U., Su, Y., Vijakrishna, D. & Smith, G. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza Other Respir Viruses*. **11**, 74-84 (2017).
- Kesson, A. M., Abd, M., Ghany, E., Cawthorne, G. A. H. & Walsh, M. G. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Wiley* 1–11 (2018).
- Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K. & Parrott, R. H. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Epidemiol.* **89**, 422–34 (1969).
- Kumar, V. Influenza in children. *Indian J Pediatr.* **29**, 297–302 (2016).
- Lee D. U., *et al.* Hematological adverse effects and pharmacokinetics of ribavirin in pigs following intramuscular administration. *J Vet Pharmacol Ther.* **40**, 561-568 (2017).
- Leneva, I. A., Falynskova, I. N., Makhmudova, N. R., Poromov, A. A. Yatsyshina, S. B. & Maleev V. V. Umifenovir susceptibility monitoring and characterization of influenza viruses isolated during ARBITR clinical study. *J Med Virol.* **91**, 588-597 (2019).

- Leyssen, P., De Clercq, E. & Neyts, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res.* **78**, 9-25 (2008).
- Macedo, M. & Mateos, S. *Infecciones Respiratorias*. Temas de *Bacteriología y Virología Médica*. Pp 137-161. Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, UDELAR. (2006).
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H.-D. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J. Virol.* **78**, 12665–12667 (2004).
- Mckimm-Breschkin, J. L. Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respi. Viruses* **7**, 25–36 (2012).
- McLellan, J. S. Structure Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *PLoS One.* **8**, 592–598 (2013).
- Mirabelli, D. *et al.* Differential antiviral activities of RSV inhibitors in human airway epithelium. *bioRxiv*. <http://dx.doi.org/10.1101/250639> (2018).
- Moesker, F. M. *et al.* Viruses as Sole Causative Agents of Severe Acute Respiratory Tract Infections in Children. *PLoS One* **11**, (2016).
- Molinari, N-AM, Ortega-Sanchez, I.R., Messonnier, M.L., Thompson, W.W., Wortley
- Moore, T. W., et al.* Synthesis and Metabolic Studies of Host Directed Inhibitors for Anti Viral Therapy. *ACS medicinal chemistry letters.* **4**, 762-767 (2013).
- Morichi, S. *et al.* Classification of acute encephalopathy in respiratory syncytial virus infection. *J. Infect. Chemother.* **17**, 776–781 (2011).
- Muniyandi, S., Pangratiou, G., Edwards, T. A. & Barr, J. N. Structure and function of the human respiratory syncytial virus M2–1 protein. *Subcell. Biochem.* **88**, 245–260 (2018).
- Murphy, B. R. & Coelingh, K. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines. *Viral Immunol.* **15**, 295–323 (2002).
- Murray, R., Rosenthal, P., Pfaller, M. *Microbiología médica*. 6ª Edición. Elsevier Mosby. (2009).
- Nayak, D. P., Balogun, R. A., Zhou, Z. H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* **31**, 1713–1723 (2009).
- Nicholson, E. G. & Munoz, F. M. A Review of Therapeutics in Clinical Development for Respiratory Syncytial Virus and Influenza in Children. *Clin. Ther.* **40**, 1268–1281 (2018).
- Noshi, T. *et al.* In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.* **160**, 109–117 (2018).
- Osterholm, M.T., Kelly, N. S., Sommer, A. & Belongia, E. A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases.* **12**, 36-44 (2012)
- Palomares-Alonso, F., Piliado, J. C., Palencia, G., Ortiz-Plata, A. & Jung-Cook, H. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **59**, 212–218 (2007).
- Pelletier, A. J., Mansbach, J. M. & Camargo, C. A. Direct Medical Costs of Bronchiolitis Hospitalizations in the United States. *Pediatrics* **118**, 2418–2423 (2006).

- Petrova, V. N. & Russell, C. A. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 47–60 (2018).
- Pillet, S. *et al.* Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and ≥50 years old adults. *PLoS One.* **14**, e0216533 (2019).
- Rafeek, R. A. M., Divarathna, M. V. M. & Noordeen, F. History and current trends in influenza virus infections with special reference to Sri Lanka. *Virusdisease.* **28**, 225–232 (2017).
- Rameix-Welti, M. A., *et al.* Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nature Communication.* *ACS Chem. Biol.* **7**, 1848–1857 (2012).
- Reina, J. & Reina, N. Favipiravir, un nuevo concepto de fármaco antiviral frente a los virus gripales. *Rev. Española Quimioter.* **30**, 79–83 (2017).
- Resch, B. Product review on the monoclonal antibody palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infection. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 1–12 (2017).
- Reyes, A., Beltán, P. & Astudillo, J. Prevalencia de Infecciones Respiratorias Agudas en Pacientes Menores de 5 años y su Asociación con Desnutrición. *Med HJCA.* **7**, 100–105 (2015).
- Rosignol, J. F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res.* **110**, 94–103 (2014).
- Roymans, D. *et al.* Therapeutic efficacy of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *Nat Commun.* **8**, 167 (2017).
- Russell, C. A. *et al.* Improving pandemic influenza risk assessment. *elife.* **3**, e03883 (2014).
- Sandhu, S. K. & Mossad S. B. Influenza in the older adult. Indications for the use of vaccine and antiviral therapy. *Geriatrics.* **56**, 43-51 (2001).
- Saunders-Hastings, P. R. & Krewski, D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens.* **5**, 66 (2016).
- Savy, V. L. & Baumeister., E. G. Capítulo 1: Orthomyxovirus. *Virología Médica, 4ta edición.* Mestre, E. O., ed, pp 273-289. Carballar, G. & Oubina, J. R. (2014).
- Schnell, J. R. & Chou J. J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature.* **451**, 591–595 (2008).
- Sharabi, S., Drori, Y., Micheli, M., Friedman, N., Orzitzer, S., Bassal, R. & Mandelboim, M. Epidemiological and Virological Characterization of Influenza B Virus Infections. *PloS one.* **11**, e0161195 (2016).
- Shu, Q. & Nair, V. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. *Med. Res. Rev.* **28**, 219–232 (2008).
- Simões E. A. & Groothuis J. R. Respiratory syncytial virus prophylaxis- the story so far. *Respir. Med.* **96**, 15-24 (2002).
- Simões, E. A. *et al.* Challenges and Opportunities in Developing Respiratory Syncytial Virus Therapeutics. *J. Infect. Dis.* **211**, 1–20 (2015).
- Simões, E. A. F. *et al.* Past, Present and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. *Infect. Dis. Ther.* **7**, 87–120 (2018).

- Skowronski, D. *et al.* A perfect storm: Impact of genomic variation and serial vaccination on low influenza vaccine effectiveness during the 2014-2015 season. *Clinical Infectious Diseases*. **63**, 21-32 (2016).
- Sleeman, K., Mishin, V. P., Deyde, V. M., Furuta, Y., Klimov, A. I. & Gubareva, L. V. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. **54**, 2517–2524 (2010).
- Stegmann, T., Hoekstra, D., Scherphof, G. & Wilschut, J. Fusion activity of influenza viruses. *J. Biol. Chem*. **261**, 10960–10966 (1986).
- Stevens, M., *et al.* Antiviral Activity of Oral JNJ-53718678 in Healthy Adult Volunteers Challenged With Respiratory Syncytial Virus: A Placebo-Controlled Study. *J. Infect. Dis*. **218**, 748-756 (2018).
- Sun, A., *et al.* Host-directed Inhibitors of Myxoviruses: Synthesis and in vitro Biochemical Evaluation. *ACS medicinal chemistry letters*. **2**, 798-803 (2011).
- Takashita, E. *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res*. **117**, 27–38 (2015).
- Taleb, S. A., Al Thani, A. A., Al Ansari, K. & Yassine, H. M. Human respiratory syncytial virus : pathogenesis , immune responses , and current vaccine approaches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **37**, 1817-1827 (2018).
- Teng, M. N. & Collins, P. L. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J. Virol*. **76**, 6164–6171 (2002).
- Tilmanis, D., Van Baalen, C., Oh, D. Y., Rossignol, J. F. & Hurt, A. C. The susceptibility of circulating human influenza viruses to tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide. *Antiviral Res*. **147**, 142–148 (2017).
- Titova, O. N. *et al.* Efficacy of Arbidol in the prevention of virus-induced exacerbations of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ter. Arkh*. **90**, 48–52 (2018).
- Tong, S. *et al.* New World bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. **9**, e1003657 (2013).
- Tran V., Moser L.A., Poole D.S. & Mehle A. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. *J Virol*. **87**, 13321–13329 (2013).
- Triantafilou, K., Kar, S., Vakakis, E., Kotecha, S. & Triantafilou, M. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: A viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax* . **68**, 66–75 (2013).
- Valcárcel, J. & Ortín, J. Viral cell biology: Influenza raids the splicing store. *Nat. Microbiol*. **1**, 16100 (2016).
- Van Heeke, G., Allosery, K., De Brabandere, V., De Smedt, T., Detalle, L. & de Fougères, A. Nanobodies as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol Ther*. **169**, 47– 56 (2017).
- Vandini, S., Biagi, C. & Lanari, M. Respiratory Syncytial Virus : The Influence of Serotype and Genotype Variability on Clinical Course of Infection. *Int. J. Mol. Sci*. **18** (2017).
- Vasin, A. V., Temkina, O. A., Egorov, V. V., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A. & Kiselev, O. I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res*. **185**, 53-63 (2014).

- Ventre, K. & Randolph, A. G. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst. Rev.* **24** (2007).
- Vergara, S. J., Gutiérrez, M. A. & Mohapatra, S. S. Molecular biology of syncytial respiratory virus and development of prophylactic strategies. *Medicine (Baltimore)*. **22**, 135–153 (2006).
- Walsh, E. E. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Illness for All Ages. *Clin. Chest Med.* **38**, 29–36 (2017).
- Wang, J., Pielak, R. M., McClintock, M. A. & Chou, J. J. Solution structure and functional analysis of the influenza B proton channel. *Nat Struct Mol Biol.* **16**, 1267–1271 (2009).
- Wang, M. & Veit, M. Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus. *Protein Cell.* **7**, 28–45 (2016).
- Weinberg, G. A. Respiratory syncytial virus mortality among young children. *Lancet Glob. Heal.* **5**, 951–952 (2017).
- Wong, S. S., & Webby, R. J. Traditional and new influenza vaccines. *Clinical microbiology reviews.* **26**, 476–492 (2013).
- Worch, R. Structural biology of the influenza virus fusion peptide. *Acta Biochim Pol.* **61**, 421-6 (2014).
- Wright, P. F., Neumann, G. & Kawaoka, Y. Orthomyxoviruses. *Fields Virology 6th Edition*. Knipe, D. M., Howley, P.M., eds, pp 1186–1239. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. (2013).
- Yamayoshi, S. & Kawaoka, Y. Current and future influenza vaccines. *Nat Med.* **25**, 212-220 (2019).
- Yang, C. F. *et al.* Implication of respiratory syncytial virus (RSV) F transgene sequence heterogeneity observed in Phase 1 evaluation of MEDI-534, a live attenuated parainfluenza type 3 vectored RSV vaccine. *Vaccine* **31**, 2822–2827 (2013).
- Yoon, J.J., *et al.* High-throughput screening-based identification of paramyxovirus inhibitors. *J Biomol Screen.* **13**, 591-608 (2008).
- Yoshimura, A. & Ohnishi, S. Uncoating of influenza virus in endosomes. *J. Virol.* **51**, 497–504 (1984).
- Zeng, L. Y., Yang, J. & Liu, S. Investigational hemagglutinin-targeted influenza virus inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **26**, 63–73 (2016).

## 9. ANEXO

---

### 9.1 Evaluación de la citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y del Oseltamivir en células A549

Los experimentos de citotoxicidad de las moléculas pertenecientes a G1 y del Oseltamivir sobre la línea celular A549 fueron realizados en 2017 en el laboratorio de VirPath y forman parte de los antecedentes por los cuales dichas moléculas fueron seleccionadas en este trabajo. En dichos ensayos se analizó la toxicidad celular de moléculas pertenecientes al grupo G1 mediante un screening utilizando diluciones al ½ y abarcando concentraciones de entre 100 y 12,5 µM. Además, se evaluó la citotoxicidad del Oseltamivir, compuesto que sería utilizado como control positivo de actividad antiviral contra el virus Influenza, a concentraciones de 10.000, 1.000, 50, 10, 5, 1 y 0,1 nM.

En el rango de concentración utilizado para las moléculas pertenecientes a G1 la viabilidad celular fue alta en todos los casos, decayendo solamente hasta un 30% al utilizar la molécula 1175 en una concentración de 50 µM. Por esta razón no se pudo realizar una curva sigmoidea dosis-respuesta de la cual inferir el CC50%, por lo cual los valores de citotoxicidad fueron expresados en base a la MCNC. Por otro lado, el Oseltamivir no disminuyó la viabilidad de los cultivos celulares de la línea A549 a ninguna de las concentraciones utilizadas, por lo cual la MCNC para dicho compuesto es 10 µM (10.000 nM). Todos los resultados se muestran a continuación en la Tabla 4.

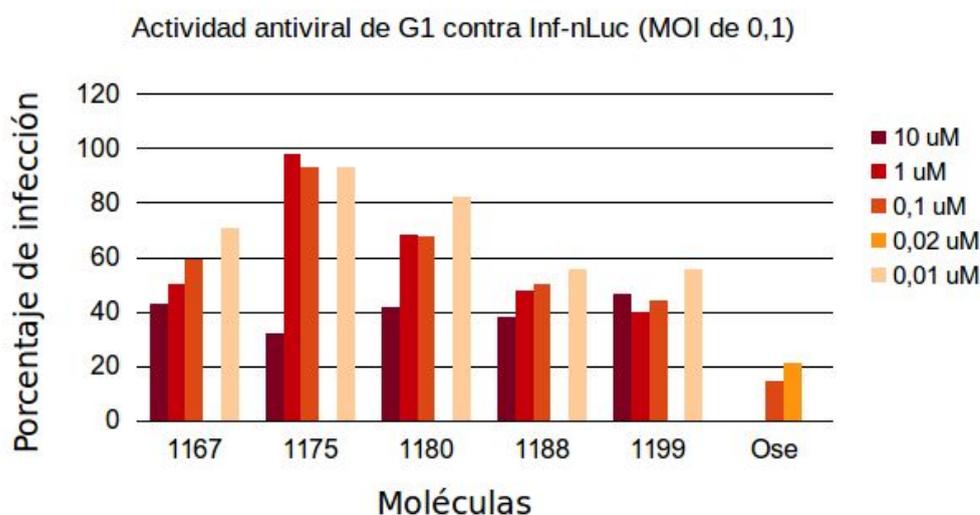
**Tabla 4. MCNC de las moléculas pertenecientes a G1 en células A549.**

<b>Molécula</b>	<b>MCNC (µM)</b>
1167	50
1175	12.5
1180	50
1188	50
1199	100
Oseltamivir	10

## 9.2 Ensayos preliminares de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra el virus influenza

Los experimentos de actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 y del Oseltamivir contra el virus influenza fueron realizados en 2017 en el laboratorio de VirPath y también forman parte de los antecedentes por los cuales dichas moléculas fueron seleccionadas en este trabajo.

En dichos ensayos se utilizó el mismo protocolo que en este trabajo, haciendo uso del virus recombinante Inf-nLuc con una MOI de 0,1 y utilizando las moléculas en un rango de concentración de entre 10 y 0,01  $\mu\text{M}$ . Además, se utilizó el Oseltamivir como control, en concentraciones 0,1 y 0,02  $\mu\text{M}$ . Los valores obtenidos fueron graficados como porcentaje de infección de los cultivos en función de la molécula utilizada para su tratamiento. Dicho gráfico puede observarse en la Figura 16.



**Figura 16. Actividad antiviral de las moléculas pertenecientes a G1 contra Influenza medida por luminiscencia.** Cuantificación del nivel de infección de los cultivos celulares infectados con Inf-nLuc (con una MOI de 0,1) luego de su tratamiento con las moléculas pertenecientes al grupo G1 (en concentraciones 10, 1, 0,1 y 0,01  $\mu\text{M}$ ) y al tratamiento con Oseltamivir (en concentraciones 0,1 y 0,02  $\mu\text{M}$ ).

Como se puede observar, todas las moléculas utilizadas disminuyen los niveles de infección de los cultivos de células A549 infectados con el virus reportero Inf-nLuc. De esta forma, a excepción de la 1175, el resto de compuestos presenta actividad antiviral a todas las concentraciones utilizadas, mientras que la 1175 disminuye la infección de los cultivos únicamente a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  en las condiciones analizadas.