Identificación de dianas terapéuticas contra la infección por SARS-CoV-2.

María Mercedes Alcón Calderón[a], Antonio Jiménez Ruiz

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. meralccal@gmail.com

Palabras clave: SARS-CoV-2; proteína de espiga (S); escisión proteolítica; dominio de unión al receptor (RBD); furina

Resumen

La aparición del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 a finales de 2019 ha resultado en una pandemia internacional debido a la multitud de contagios y muertes documentadas. Los coronavirus provocan enfermedades respiratorias de gravedad gradual, llegando a producir lesiones pulmonares graves e incluso fallo multiorgánico. A pesar de que diferentes tipos de coronavirus han infectado a humanos con anterioridad, es necesaria una investigación en profundidad del SARS-CoV-2 para poder abordar diferentes estrategias terapéuticas frente a la infección que produce. En este artículo, se presentan las características fundamentales del SARS-CoV-2 que favorecen la elevada infectividad y transmisibilidad del virus, así como sus diferencias principales con los coronavirus que le preceden. En este sentido, este virus utiliza el receptor ECA-2 para su entrada en las células y, en el proceso infectivo, es fundamental la participación de una glucoproteína de espiga (S) que se encuentra anclada a la envoltura de SARS-CoV-2. Gracias a varios estudios independientes, se ha podido determinar el mecanismo por el que se produce el reconocimiento entre el virus y su receptor celular, en el que interviene fundamentalmente la proteína S. Asimismo, se ha encontrado que esta proteína alberga un sitio de escisión de furina, una proteasa encargada del procesamiento proteolítico de las subunidades de la proteína S y cuyo papel es primordial para que se produzca la fusión de membranas vírica y celular. Finalmente, en base al estudio realizado, se proponen diversos inhibidores basados en el bloqueo de la interacción virus-receptor y de la fusión de membranas, que se fundamentan en la implicación del dominio de unión con el receptor (RBD) de la proteína S y en la proteasa furina como principal desencadenante del proceso de fusión a través de la escisión proteolítica.

Cita: Alcón Calderón, María Mercedes; Jiménez Ruiz, Antonio (2020) Identificación de dianas terapéuticas contra la infección por SARS-CoV-2. dianas 9 (2): e202009fa01. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202009fa01 http://www3.uah.es/dianas?e202009fa01. URI http://hdl.handle.net/10017/15181

Copyright: © Alcón-Calderón MM, Jiménez-Ruiz A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Introducción

A finales de diciembre de 2019 se reportaron casos de un nuevo coronavirus (COVID-19) en Wuhan, China. Este virus se denomina SARS-CoV-2 o coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 y pertenece a la familia *Coronoviridae*, una familia de virus caracterizada por poseer un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo [1]. Desde que se produjo el primer caso de infección, el número de afectados asciende de forma notoria y la Organización Mundial de la Salud declaró la emergencia sanitaria provocada por el brote del nuevo coronavirus a nivel de pandemia internacional el 11 de marzo de 2020. A día 2 de junio, se han reportado 6,194.533 número de afectados y la enfermedad se registra en más de 214 territorios provocando 376.320 muertes [2].

Sin embargo, el SARS-CoV-2 no ha sido el primer tipo de coronavirus registrado en lo que llevamos de siglo. Los coronavirus humanos se describieron por primera vez en la década de 1960 y en el período 2003-2005 fueron identificadas cinco nuevas cepas de coronavirus relacionadas con infecciones respiratorias en humanos [3]. Actualmente existen siete cepas que afectan al ser humano, al incorporarse a la lista el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio o MERS-CoV en 2012 y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 o SARS-CoV-2 en 2019 [1, 4]. Las cepas HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HKU1 son coronavirus que provocan una enfermedad leve de las vías respiratorias superiores. No obstante, las cepas SARS-CoV y MERS-CoV ganan importancia debido a que infectan el tracto respiratorio inferior y pueden provocar una grave enfermedad respiratoria en humanos [4].

El SARS-CoV surgió en Guangdong a finales del 2002 y, desde que se reportó el primer caso, se desarrolló una epidemia que afectó a más de 8.000 personas distribuidas en 23 países diferentes en el año 2003, provocando un total de 774 muertes. La infección por este coronavirus provoca síntomas tales como fiebre, malestar general, dolor de cabeza, escalofríos o tos, aunque puede dar lugar a

complicaciones que conllevan una dificultad en la capacidad respiratoria. No obstante, finalizada la epidemia en julio de 2003, actualmente no se reportan casos de transmisión del virus [5]. Por otro lado, en el caso del MERS-CoV, éste fue documentado en 2012 y desde entonces se han notificado 2.494 casos de infección y 858 muertes en 27 países en los que ha sido reportado [6]. El primer caso por coronavirus MERS-CoV apareció en Jeddah, Reino de Arabia Saudita, en junio de 2012 y en la mayoría de los casos provoca enfermedades respiratorias, neumonía, dificultad respiratoria aguda y fallo multiorgánico [7]. En este sentido, la infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 provoca síntomas que varían desde fiebre o tos hasta neumonía, insuficiencia respiratoria, lesiones cardíacas, lesiones renales y muerte, además de mostrar una transmisibilidad superior a los anteriores [8].

De este modo, a pesar de la similitud existente entre los diferentes tipos de coronavirus que han surgido en este siglo, entre éstos también existen diferencias relevantes. El SARS-CoV surgió tras la transmisión zoonótica de murciélagos, lo que parece coincidir con la procedencia del SARS-CoV-2 [9]. No obstante, recientes estudios sugieren que el origen de este coronavirus se debe a la recombinación entre una cepa de murciélago y otra de pangolín [10]. Sin embargo, el MERS-CoV se debe a la transmisión a través de camellos dromedarios. Todas estas infecciones víricas conducen a un cuadro clínico en el que se presenta fiebre y tos y conducen normalmente a enfermedades del tracto respiratorio. No obstante, el brote de SARS-CoV quedó contenido en 2003, mientras que el MERS-CoV sigue en curso hoy en día. Por otro lado, la elevada transmisibilidad de SARS-CoV-2 ha provocado una importante propagación de la infección que ha derivado en un número de muertes muy superior a las producidas por las infecciones virales anteriores [9].

En el caso de la infección producida por SARS-CoV-2, al igual que en las diferentes infecciones producidas por coronavirus, los síntomas son variables en función de la fase de la enfermedad. En primer lugar, se produce el período de incubación, que para el caso del nuevo coronavirus se sitúa en 14 días como el tiempo más largo pronosticado. En este período se facilita la propagación de la infección, por lo que es necesario el aislamiento a lo largo de esta etapa para lograr la contención [11], debido a que la transmisión de persona a persona es notablemente considerable. No obstante, la supresión de todas las posibles vías de transmisión permite un control más exhaustivo de la patología en la población [12].

Una vez superada la fase de incubación, se da lugar a una infección cuya gravedad queda clasificada en tres tipos diferentes. En el caso de menor gravedad se encuentra la infección precoz, en la que se presentan síntomas no específicos como fiebre, tos seca y malestar general. El siguiente nivel corresponde a una fase pulmonar de gradualidad variable en la que los pacientes pueden padecer insuficiencia respiratoria con o sin hipoxia. Por último, se encuentra la fase de inflamación extra-pulmonar sistémica, debida a la respuesta del huésped, en la que se origina una hiperinflamación. En los casos más graves se produce distrés respiratorio agudo, disfunción orgánica y shock séptico [13].

Taxonomía y estructura

Los coronavirus son un grupo de virus de cadena de ARN no segmentada y sentido positivo. Su nombre se le atribuye a la forma de corona que presentan en la visualización por microscopía electrónica. Los coronavirus se clasifican en el orden *Nidovirales* y pertenecen a la familia *Coronoviridae*. Dentro de ésta, se engloban en la subfamilia *Orthocoronavirinae*, que a su vez se clasifica en cuatro géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus*. El género beta se divide en cinco subgéneros y los murciélagos y roedores son reservorios de este tipo. Esta familia de virus causa enfermedades respiratorias agudas en diversos animales y, como se ha mencionado anteriormente, se han identificado siete tipos de coronavirus con capacidad de infectar a humanos. De este modo, el SARS-CoV-2 es un tipo de *Betacoronavirus* de forma redonda que posiblemente surgió de la progresión evolutiva de una cepa existente en murciélagos en la que se producirían diversas mutaciones [14]. Sin embargo, recientes estudios sitúan al pangolín como otro de los reservorios de SARS-CoV-2, y el origen puede deberse a una selección natural en el animal de origen o en la transmisión humana [15].

El virión presenta cuatro proteínas esenciales que desempeñan un papel de vital importancia en la estructura vírica: proteína de la nucleocápside (N), proteína transmembrana (M), proteína de la envoltura (E) y proteína de espiga (S). En primer lugar, la proteína N tiene la función de unirse al ARN genómico del virus y formar la nucleocápside. Además, participa en el proceso de replicación viral y en la respuesta del huésped a la infección. La proteína M se encarga de dar forma a la envoltura del virus, mientras que la proteína E participa en la maduración y en el ensamblaje. Por último, la proteína S es la encargada del reconocimiento de los receptores celulares y posibilita la entrada del virus en el huésped mediante un proceso de fusión de ambas membranas [13, 16].

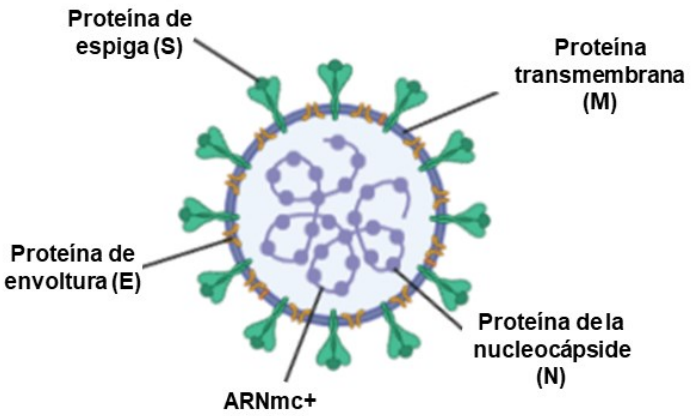

Figura 1.- Estructura de SARS-CoV-2. Adaptado de [14]. (Contribuido por Rohan Bir Singh; elaborado con Biorender.com)

Elementos esenciales en el reconocimiento virus-célula

La unión del virus a los receptores celulares del huésped es mediada a través de la proteína S. Esta proteína pesa entre 180 y 220 kDa, está anclada a la envoltura y es la que proporciona la apariencia de corona del virus por su forma de espiga o espícula [17]. La proteína S es una proteína trimérica y está relacionada con la fusión de las membranas de las células huésped y del virus y con la infectividad y la funcionalidad del mismo [18]. De este modo, se trata de una glucoproteína de membrana tipo 1 [4] y se divide de forma funcional en los dominios S1 y S2. El dominio S1 es el encargado del reconocimiento y unión al receptor, mientras que el dominio S2 es responsable de la fusión de las membranas víricas y celulares [19]. La interacción entre el receptor celular, en este caso la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2), y el SARS-CoV-2 se produce gracias a la proteína S a través de su dominio de unión al receptor (RBD) situado en el extremo C-terminal de S1 [5]. Del mismo modo, ECA-2 es también uno de los receptores celulares para SARS-CoV, además de la aminopeptidasa N y la dipeptidil peptidasa 4. No obstante, el SARS-CoV-2 no utiliza estos dos últimos receptores y su unión a ECA-2 se realiza con una afinidad de hasta 20 veces mayor que en el caso de SARS-CoV, lo que podría explicar la elevada infectividad del virus [19]. Los dominios RBD de SARS-CoV y SARS-CoV-2 presentan una elevada similitud de secuencia y ambos coronavirus se ensamblan en el mismo punto del receptor ECA-2 humano [18]. Además de ello, los diferentes cambios que puedan producirse en los residuos que intervienen en la unión entre ambas proteínas facilitan el salto de huésped y la transmisión entre personas [20].

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2) es una monocarboxipeptidasa cuya función es eliminar aminoácidos del extremo C-terminal del sustrato [21]. Este receptor es imprescindible para permitir la entrada del virus en el huésped y la replicación del mismo. El receptor se encuentra ampliamente distribuido en las células epiteliales alveolares tipo II (AECII) del pulmón, lo que favorece que este órgano presente mayor vulnerabilidad a la infección viral. No obstante, la expresión del receptor ECA-2 se encuentra también en otros tejidos como el corazón, los riñones y especialmente en la superficie de las células epiteliales intestinales. Debido a ello, el intestino es otra zona de vital importancia para la entrada del SARS-CoV-2 [22].

La principal función del ECA-2 es la maduración de la angiotensina, una hormona esencial para controlar los procesos de vasoconstricción y presión arterial. Esta enzima consta de un dominio peptidasa (PD) en el extremo N-terminal, un dominio C-terminal similar a colectrina (CLD) y un tramo intermedio de aproximadamente 40 residuos. Esta enzima convierte la angiotensina (Ang) I en Ang-(1-9), la cual es escindida por otras enzimas dando lugar a Ang-(1-7). Además, ECA-2 puede realizar la conversión directa de Ang-(1-7) a partir de Ang II.

La unión de S1 al receptor es mediada a través del dominio RBD, que interacciona de forma directa con el dominio peptidasa (PD) de ECA-2. En esta asociación cobran importancia las interacciones polares y cada dominio RBD de S1 interacciona con un dominio PD de ECA-2 [23]. La interacción pone en contacto 17 residuos del dominio RBD con 20 residuos de ECA-2. Dentro del dominio RBD, el bucle de unión al receptor es el motivo RBM [20]. Aunque SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten 8 residuos idénticos en RBM para la unión con el receptor, existen otros 6 residuos que se encuentran modificados entre ambos y que, presumiblemente, son responsables de sus diferencias a nivel de afinidad [24]. En todo caso, una vez establecido el reconocimiento, el dominio PD de ECA-2, formado por dos lóbulos, sufre un cambio de conformación que acerca a los mismos para el correcto acoplamiento del sustrato [20]. De esta

manera, el dominio RBD en S1 de SARS-CoV-2 interacciona, gracias a una estructura cóncava externa, con el lóbulo pequeño de ECA-2, acoplando el N-terminal del receptor [24].

La interacción entre la proteína S y el receptor ECA-2 conduce a una sucesión de procesos que permiten la entrada celular. En este sentido, es importante la configuración de la proteína S, ya que ésta puede encontrarse en dos formas diferentes. Una de las formas puede observarse en el caso de viriones maduros en el momento previo a la fusión, en el que la proteína S presenta una estructura heterotrimérica en la que tres subunidades S1 quedan soportadas por una subunidad S2. La segunda forma aparece una vez producida la fusión de las membranas, en la que la estructura presenta una apariencia en espiral en la que solo está presente S2. Diversos estudios enfocados en la interacción con el receptor demuestran que esta unión permite la estabilización del dominio C-terminal (CTD) de S1 y es entonces cuando se produce la disociación de S1 y S2 [25]. Esto facilita la fusión de membranas al permitir que S2 pase a un estado más estable de post-fusión a partir del estado metaestable previo a la fusión en el que se encontraba [24].

Elementos esenciales para la invasión del virus: fusión de membranas del virus y la célula

El SARS-CoV-2 es un virus con envoltura, por lo que para poder llevar a cabo la infección y la introducción del genoma vírico en la célula huésped es necesario un proceso de fusión de ambas membranas. Para la activación de este proceso entran en juego numerosos factores entre los que destaca la proteólisis, que provoca cambios estructurales en las proteínas víricas que intervienen en el proceso de fusión.

Con el objetivo de llevar a cabo la infección y, previamente al proceso de fusión, este virus utiliza la endocitosis como mecanismo principal de entrada en la célula, proceso que puede estar mediado por clatrina y caveolas, como en el caso de SARS-CoV, o ser independiente de éstas [26]. Por tanto, el mecanismo de entrada puede variar dependiendo del tipo de virus y de las células afectadas [27]. Por ejemplo, el SARS-CoV utiliza la endocitosis para su ingreso en las células y es la escisión proteolítica de la proteína S la que desencadena el proceso de fusión de membranas. En esta escisión están implicadas determinadas proteasas de la célula huésped como tripsina o catepsina, cuya acción es un requisito fundamental en el proceso de fusión viral [28]. En el caso del coronavirus de la hepatitis de ratón (MHV), éste utiliza la endocitosis mediada por clatrina como mecanismo de entrada y la escisión proteolítica de la proteína de fusión es dependiente del tráfico a los lisosomas, ya que estos orgánulos son los encargados de promover señales determinantes para la fusión de las membranas vírica y celular [26].

Los factores que determinan el proceso de infección presentan variabilidad dependiendo del tipo de proteína de fusión implicada, ya que algunas son dependientes de bajos valores de pH y, en cambio, otras actúan de manera independiente a estos valores, por lo que la mera unión al receptor desencadena la fusión. No obstante, la fusión de membranas en SARS-CoV-2, al igual que en diferentes coronavirus, está promovida por la escisión entre las subunidades S1 y S2 de la glucoproteína S [29]. De este modo, en el proceso de fusión está implicada la subunidad S2, mientras que la subunidad S1 ocupa un papel relevante en el reconocimiento y unión al receptor. En consecuencia, la subunidad S2 se caracteriza por contener en su estructura un péptido de fusión (PF), dos dominios con repeticiones de 7 residuos (HR1 y HR2) y un dominio transmembrana (TM) que intervienen en este proceso [26].

El proceso de invasión celular se inicia con el reconocimiento del receptor por la subunidad S1 de la proteína S, tras el cual, mediante un proceso de endocitosis, tiene lugar la internalización del virus. Una vez que el virus ha entrado en la célula debe efectuarse la liberación de su material genético en el citoplasma. En este sentido, se requieren diversos cambios de conformación que permitan el acercamiento de las membranas viral y endosomal y la fusión de las mismas, con el objetivo de que posteriormente el genoma vírico sea liberado y se produzca la replicación viral [30].

Los cambios de conformación que provocan que ambas membranas se aproximen y fusionen vienen determinados por la escisión proteolítica de la proteína S. Ambas subunidades de la proteína se encuentran en un estado de prefusión [31] y la escisión proteolítica entre ambas subunidades conlleva que la subunidad S2 sufra reorganizaciones conformacionales que permiten el acercamiento de las membranas, pasando a un estado de post-fusión estable. En concreto, los reordenamientos estructurales en S2 exponen el sitio de escisión en esta subunidad (S2'), que es cortado por proteasas. Esta misma reorganización deja también accesible el péptido de fusión PF, lo que induce la formación de un paquete de 6 hélices (6-HB) que favorece el acercamiento entre las membranas [32]. La formación del paquete 6-HB viene mediado por la interacción de los dominios HR1 y HR2 de esta subunidad, los cuales se organizan de manera antiparalela. Esta configuración permite que el péptido PF se incluya en la membrana celular, mientras que el dominio TM se encuentra insertado en la membrana viral. De este modo, la formación del paquete 6-HB tras la escisión proteolítica induce el acercamiento de las membranas que, finalmente, permite la fusión de las mismas [33]. No obstante, la interacción entre HR1 y HR2 puede sufrir variaciones, ya que en comparación con el SARS-CoV, el dominio HR1 de SARS-

CoV-2 difiere en 8 residuos, a pesar de que entre ambos coronavirus existe una elevada homología de secuencia [34].

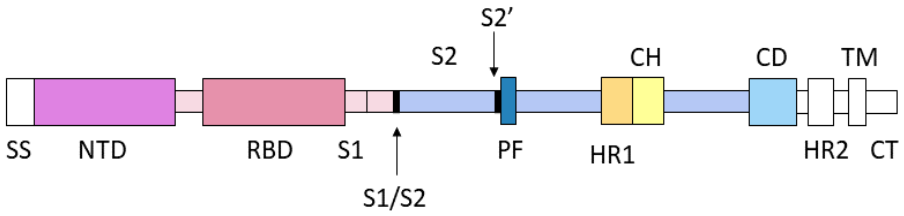

Figura 2.- Esquema de la estructura primaria de la proteína S de SARS-CoV-2. SS: secuencia señal, NTD: dominio N-terminal, RBD: dominio de unión al receptor, S1: subunidad S1, S2: subunidad S2, S1/S2: sitio de escisión de proteasa S1/S2, S2': sitio de escisión de proteasa S2', HR1: dominio con repeticiones de 7 residuos 1, CH: hélice central, CD: dominio conector, HR2: dominio con repeticiones de 7 residuos 2, TM: dominio transmembrana, CT: cola citoplasmática. Adaptado de [35].

Importancia de la escisión en el límite S1/S2 por proteasas

Como se ha mencionado, la escisión proteolítica es un paso de vital importancia para producirse la infección, ya que determina el acercamiento de membranas y la fusión de las mismas. La proteína S de SARS-CoV-2 presenta dos sitios de escisión determinantes. En primer lugar, contiene un sitio de corte S1/S2 entre ambas subunidades y, además, la presencia de otro sitio de escisión en la subunidad S2 (S2') es otro punto fundamental para llevar a cabo el proceso [32]. Este segundo sitio de escisión en SARS-CoV-2 es equivalente al que se encuentra en SARS-CoV, mientras que el sitio de escisión S1/S2 puede contener diferentes motivos en función de cada tipo de coronavirus [36].

En el reconocimiento del receptor celular interviene la subunidad S1, en cuya estructura se diferencian 4 dominios (N-terminal o NTD y C-terminal o CTD subdividido en CTD1, CTD2 y CTD3). La conformación del dominio CTD1, implicado en el reconocimiento, es clave para el proceso, ya que la subunidad queda activa para la unión con el receptor ECA-2 al encontrarse en una conformación "*hacia arriba*". Una vez realizado el reconocimiento y, tras la internalización, se produce la escisión de la subunidad S1. Esto permite que se promuevan cambios de configuración que inducen la exposición del sitio de escisión en S2, previamente oculto, con el objetivo de que las proteasas actúen a este nivel [32]. En consecuencia, la escisión proteolítica de la proteína S permite la fusión de las membranas vírica y celular y se produce entonces la liberación del ARN genómico del virus en el citoplasma de la célula huésped [33].

Por tanto, la escisión proteolítica ejercida por proteasas es fundamental en el proceso infectivo. En el caso del SARS-CoV, diversas proteasas intervienen en la escisión una vez producido el reconocimiento y la entrada del virus en los endosomas. Entre ellas se encuentran la catepsina L, que podría actuar de forma equivalente en SARS-CoV-2 [37] y la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), cofactor del receptor ECA-2 [38]. En relación con el SARS-CoV-2, éste presenta un sitio de corte por furina en S1/S2, que no se ha observado en el SARS-CoV y que influye de manera directa en el acceso a la célula [37]. Este motivo de escisión por furina surge debido a cuatro residuos en este punto que generan un sitio de escisión polibásico, lo que podría esclarecer el hecho de que el nuevo coronavirus presente una elevada capacidad de transmisión [31]. En este sentido, SARS-CoV-2 utiliza un mecanismo de activación en el que, en primer lugar, se produce una escisión proteolítica en S1/S2 por furina y, posteriormente, se completa la activación de la proteína S por la proteasa TMPRSS2, cuya actuación es dependiente de la escisión por furina, consiguiéndose así la infección de las células [39].

En consecuencia, es evidente el hecho de que la mera interacción del virus con el receptor ECA-2 es insuficiente para la infección de las células huésped por el virus. De este modo, es necesaria la activación de la proteína S, que conlleva la escisión de ambas subunidades mediante proteasas, requisito previo al proceso de fusión de membranas. En el caso de SARS-CoV, que presenta un sitio de escisión por catepsina L en el límite S1/S2, se ha observado que la inclusión de un sitio de escisión por furina permite una fusión más potente [40]. Por tanto, la escisión proteolítica por furina no tiene un papel importante en el proceso de entrada, pero es fundamental para potenciar la actividad de fusión entre la membrana viral y la celular [41].

Papel de la furina en la infección

La furina es una proproteína convertasa (PC) que se engloba dentro de una familia de nueve proteasas [36] que intervienen en gran cantidad de procesos como la propagación de virus, activación de toxinas o cáncer [42]. Esta enzima se encuentra en la superficie celular asociada a la membrana, aunque se ha observado que también está presente en el complejo de Golgi [43]. Se encarga de metabolizar proteolíticamente a sus sustratos en la vía secretora [44], participa en la activación de proteínas mediante

proteólisis y, debido a su colaboración en la escisión de glucoproteínas de la envoltura vírica, permite la fusión de membranas en el proceso de infección viral [36].

El sitio de escisión por furina está presente en otros tipos de coronavirus, como en el caso del MERS-CoV, cuya secuencia se encuentra aguas arriba del péptido de fusión. La presencia de este sitio de escisión conlleva que no se requiera un transporte a los lisosomas para producirse la liberación del ARN viral, pero sigue siendo dependiente de un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina y de la escisión por furina para una infección exitosa. A diferencia de lo descrito para SARS-CoV-2 y MERS-CoV, el coronavirus MHV requiere de la fusión entre endosomas y lisosomas para la escisión de la proteína S y la inducción de los cambios conformacionales que permiten la fusión. Sin embargo, la introducción de un sitio de escisión por furina en MHV suprime la necesidad de esta incorporación de los lisosomas y la entrada viral se produce gracias a la escisión proteolítica por furina [26].

Tanto el MERS-CoV como el SARS-CoV-2 contienen una secuencia reconocible por furina: RSVR (Arg-Ser-Val-Arg) para el coronavirus del síndrome de Oriente Medio y RRAR (Arg-Arg-Ala-Arg) para el nuevo coronavirus [45] o motivo PRRA (secuencia PRRAR) [36]. Además de ello, motivos similares aparecen en otros géneros de coronavirus, por lo que este sitio de escisión en el límite S1/S2 puede provenir de la existencia del mismo en diferentes tipos de coronavirus ya existentes [45]. La escisión por furina se produce principalmente en motivos RXRR o RXKR (Arg-X-Lys-Arg) y la secuencia mínima para esta escisión debe ser RXXR [46].

La proteína S de SARS-CoV-2 presenta un motivo PRRA de escisión por furina que posibilita la entrada del genoma viral al citoplasma. Asimismo, la escisión proteolítica de la proteína S en este sitio de corte puede conducir a una afinidad más elevada en la unión del virus con el receptor ECA-2. Este hecho determina la infectividad viral, principalmente porque una mayor afinidad por el receptor puede contribuir a un mayor nivel de patogenicidad. Adicionalmente, se ha demostrado que la furina puede ser secretada y, de este modo, puede actuar a nivel extracelular ejerciendo su papel en células en las que la expresión de furina es ausente, lo que puede influir de manera significativa en la elevada transmisibilidad del virus en los humanos. El motivo PRRA de corte por furina no está presente en el SARS-CoV, lo que es de vital importancia ya que el bloqueo de catepsina L y TMPRSS2 es suficiente para impedir la entrada de este coronavirus en las células [38]. En este sentido, para impedir la infección por SARS-CoV-2 podría ser necesario una inhibición conjunta de furina y de TMPRSS2 [39].

Elementos clave en la elevada infectividad de SARS-CoV-2

Según este estudio, es importante resaltar la importancia de dos elementos fundamentales que determinan la infectividad del SARS-CoV-2 y su alta transmisibilidad.

En primer lugar, el dominio RBD presenta una elevada afinidad de unión a los receptores ECA-2. Se ha observado que la secuencia de este dominio presenta variaciones entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV, por lo que la elevada afinidad del nuevo coronavirus podría explicarse mediante un proceso de selección natural [47]. Como se ha expuesto, el motivo RBM, de unión al receptor en el RBD, presenta diferencias entre ambos coronavirus. En concreto, 6 residuos están modificados en SARS-CoV-2 y estos cambios podrían provocar una transmisión mucho más eficaz [24]. Por consiguiente, debido a las diferencias estructurales, el motivo RBM de SARS-CoV-2 presenta puntos de contacto más fuertes con el dominio PD de ECA-2, lo que favorece en mayor medida la unión entre ambos [48]. Además de ello, determinados estudios confirman que la combinación de residuos en RBD que mejoran la unión al receptor, provocan un aumento de la afinidad y una entrada más eficiente [49]. De este modo, son las variaciones en la secuencia y, consecuentemente, en la organización estructural, las que contribuyen a un cambio en la afinidad por el receptor [50]. En este sentido, la similitud entre ambos coronavirus en el RBD es de un 76%, mientras que para el motivo RBM es tan solo del 53%. Estos niveles de similitud explican que ambos virus reconozcan al mismo receptor ECA-2, pero con diferente nivel de afinidad [49]. De este modo, estas variaciones en la secuencia provocan que la proteína S de SARS-CoV-2 presente una afinidad significativamente mayor por el receptor, en comparación con la proteína S de SARS-CoV, lo que puede influir en aumentar la transmisión entre humanos [19].

No obstante, la elevada afinidad de SARS-CoV-2 por el receptor celular no es suficiente para explicar la alta transmisibilidad entre humanos. De este modo, es necesaria la intervención de otros factores para una propagación eficaz. En este sentido, el sitio de escisión por furina en S1/S2 contribuye a facilitar la transmisión, ya que el corte por esta proteasa es fundamental para la capacidad infectiva del virus. Este sitio de corte no ha sido observado en coronavirus como el SARS-CoV pero, tal y como se ha demostrado experimentalmente, su inserción artificial ha mejorado enormemente la unión intercelular y la capacidad de transmisión de este virus [47]. Asimismo, la escisión proteolítica es un paso fundamental en la infección, por lo que el sitio de escisión por furina interviene en la transmisión y patogenicidad del virus [31]. En concreto, es esta escisión por furina la que permite la fusión de las células y, consecuentemente, la liberación del ARN genómico del virus en el citoplasma de la célula huésped [39]. Además de ello, diversos estudios indican que el sitio de corte por furina determina una vulnerabilidad mayor de las

células a la infección ya que, adicionalmente, la actuación de la furina provoca reorganizaciones estructurales de la proteína S que determinan una afinidad de unión mayor y una fusión de membranas más eficiente [38]. Además, la presencia de este sitio de escisión suprime el requisito de fusión entre endosomas y lisosomas, por lo que la actuación de la furina en el endosoma temprano provoca la escisión de las subunidades de la proteína S y desencadena el proceso de fusión de membranas [39]. De este modo, la secuencia reconocida por furina es fundamental en el proceso y es de vital importancia en la capacidad de infección [31].

Dominio RBD y furina como dianas terapéuticas: búsqueda de inhibidores

En base al estudio propuesto, tanto el dominio RBD de la subunidad S1 como la proteasa furina ejercen un papel fundamental en la infección por SARS-CoV-2. Por tanto, se proponen ambos como dianas terapéuticas identificadas, ya que la actuación de las mismas es un requisito primordial para la progresión de la infección por este coronavirus. De este modo, cualquier posible alteración en la estructura o en el mecanismo de acción de estas proteínas puede conducir a un efecto terapéutico.

La proteína S interacciona a través de su dominio RBD, situado en la subunidad S1, con el dominio PD del receptor ECA-2 [23]. Esta interacción permite la entrada celular y, posteriormente, se induce la escisión proteolítica en S1/S2 desencadenando la fusión de membranas [25]. Por tanto, el primer requisito fundamental para llevar a cabo la infección es el reconocimiento del SARS-CoV-2 a su receptor celular ECA-2, unión que se produce con una afinidad muy elevada, lo que contribuye a aumentar la infectividad viral [19].

Es importante destacar que el receptor ECA-2 se encuentra principalmente en las células epiteliales alveolares tipo II, ejerciendo una protección al pulmón frente a diversos daños, por lo que la infección por SARS-CoV-2 produce una grave patología pulmonar [51]. De este modo, se puede seguir una estrategia de inhibición de esta unión que impida el reconocimiento y, consecuentemente, la infección. Para ello, podría ser posible utilizar la forma recombinante humana soluble del receptor ECA-2 (rhsECA-2) como inhibidor, impidiendo la entrada del virus en la célula al bloquear la interacción entre el dominio RBD de S1 y el receptor ECA-2 [1]. La forma soluble de ECA-2 carece del dominio transmembrana, por lo que no puede anclarse a la membrana plasmática. En este sentido, rhsECA-2 puede actuar como un inhibidor competitivo que evita la unión de SARS-CoV-2 al receptor ECA-2 [52]. La interacción entre la proteína S de SARS-CoV-2 y el receptor ECA-2 ha sido estudiada por varios grupos de investigación. Diversos estudios *in vitro* confirman que rhsECA-2 impide la infección por este coronavirus en las primeras etapas y el grado de inhibición depende de manera directa de la dosis utilizada [51]. Además, diversas estrategias terapéuticas se enfocan en impedir la interacción virus-receptor y, en este sentido, está en investigación la utilización de péptidos derivados de la subunidad S1 que ocupen el sitio de unión al receptor ECA-2 [53].

En el caso de la furina, esta enzima participa en el procesamiento proteolítico de la glucoproteína S, ejerciendo su acción en motivos polibásicos. La escisión proteolítica de la glucoproteína S es fundamental para llevar a cabo la infección por SARS-CoV-2 y, consecuentemente, una estrategia terapéutica sería la utilización de inhibidores de furina [54]. Determinados estudios confirman que los péptidos que contienen poliarginina son inhibidores de esta proteasa. Esta inhibición se basa en el conocimiento de que el sitio activo de esta enzima contiene en su motivo de unión al sustrato numerosos residuos cargados negativamente, por lo que los péptidos con poliarginina, que se encuentran cargados positivamente, son potentes inhibidores debido al carácter ácido del sitio activo de la furina, y su potencial inhibitorio aumenta en función de la cantidad de residuos básicos en la estructura de los mismos. Diversos factores intervienen en la capacidad inhibitoria, ya que además de la longitud de la cadena, son importantes las modificaciones en los extremos del péptido. En concreto, se ha demostrado que la introducción de un grupo amida en el C-terminal de D-poliargininas provoca un aumento de la capacidad inhibitoria, por lo que el estudio de posibles modificaciones puede conducir a la obtención de inhibidores más potentes. En concreto, la D9R o nona-D-arginina ha demostrado ser un inhibidor eficaz de furina, que presenta una elevada estabilidad y especificidad [55].

Del mismo modo, se han desarrollado inhibidores de furina análogos de sustrato en los que se introducen péptidos miméticos de arginina descarboxilados, como 4-amidinobencilamida, y este reemplazo muestra una alta potencia inhibitoria frente a esta proteasa [42]. En el caso del SARS-CoV, la infección puede ser bloqueada utilizando péptidos inhibidores de catepsina L, ya que esta enzima es la que cataliza la escisión proteolítica en este coronavirus [41]. Así, la utilización de inhibidores de furina, la cual no interviene en la escisión proteolítica de la proteína S de SARS-CoV pero sí actúa en el caso del MERS-CoV y el SARS-CoV-2, ha demostrado bloquear la disociación y, consecuentemente, la infección en los coronavirus que requieren de esta proteasa [39].

Por otro lado, existe una gran variedad de estrategias terapéuticas en investigación y, en el caso de las vacunas, parece ser prometedor el uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-SARS-CoV-2.

Estos anticuerpos pueden ir dirigidos contra la proteína S de SARS-CoV-2, y se espera que sea una estrategia terapéutica prometedora [33]. En relación con otras posibles dianas que no han constituido el objeto de estudio de este trabajo, es de destacar el uso de fármacos como remdisivir y favipiravir. Estos fármacos se basan en la inhibición de la ARN polimerasa, por lo que se produce un bloqueo de la replicación viral [1]. No obstante, actualmente no se ha encontrado ningún fármaco que exhiba una gran especificidad y eficacia frente a esta diana, por lo que es fundamental realizar una investigación en profundidad que permita la identificación y caracterización de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de sus correspondientes inhibidores de cara a conseguir un tratamiento más efectivo contra la infección [16].

Agradecimientos

Esta revisión forma parte de un proyecto de investigación realizado por el grupo de "Mecanismo de acción de moléculas con actividad biológica" de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Alcalá.

Especial mención a Antonio Jiménez Ruiz, por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por guiarme en el camino y por transmitirme tantos de sus conocimientos para llevar a cabo el estudio.

Referencias

1. Tu, Y. F., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T. and Wang, M. L. 2020. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. International Journal of Molecular Sciences, 21(7):2657.
2. World Health Organization. 2020 (3 June). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 134. Retrieved from https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200602-covid-19-sitrep-134.pdf?sfvrsn=cc95e5d5_2
3. Kahn, J. S., & McIntosh, K. 2005. History and recent advances in coronavirus discovery. The Pediatric Infectious Disease Journal, 24(11):S223-S227.
4. Hasöksüz, M., Kiliç, S., and Saraç, F. 2020. Coronaviruses and SARS-COV-2. Turkish Journal of Medical Sciences, 50(SI-1):549-556.
5. World Health Organization. 2020 (20 April). SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) Retrieved from https://www.who.int/ith/diseases/sars/en/
6. World Health Organization. 2020 (20 April). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Retrieved from https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/
7. Who Mers-Cov Research Group. 2013. State of knowledge and data gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. PLoS currents, 5:ecurrents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8.
8. Holstein, B. 2020. Coronavirus 101. The Journal for Nurse Practitioners.
9. Wu, Z. and McGoogan, J. M. 2020. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. Jama, 323(13):1239-1242.
10. Huang, J. M., Jan, S. S., Wei, X., Wan, Y. and Ouyang, S. 2020. Evidence of the Recombinant Origin and Ongoing Mutations in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). BioRxiv.
11. Jiang, X., Rayner, S. and Luo, M. H. 2020. Does SARS-CoV-2 has a longer incubation period than SARS and MERS?. Journal of Medical Virology.
12. Bulut, C. and Kato, Y. 2020. Epidemiology of COVID-19. Turkish Journal of Medical Sciences, 50(SI-1):563-570.
13. Loras, C. and Sanz, J. C. 2020. Información preliminar de las características virológicas del nuevo coronavirus SARS-CoV-2. Revista Madrileña de Salud Pública, 4(2):1-10.
14. Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C. and Di Napoli, R. 2020. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). In Statpearls [internet]. StatPearls Publishing.
15. Diez-Fuertes, F., Plaza-Ramos, J. A. and Coronavirus, G. D. A. C. 2020. Origen del SARS-CoV-2.
16. Schoeman, D. and Fielding, B. C. 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. Virology Journal, 16(1):69.

17. Salas-Asencios, R., Iannacone-Oliver, J., Guillén-Oneeglio, A., Tantaléan-Da Fieno, J., Alvariño-Flores, L., Castañeda-Pérez, L. et al. 2020. Coronavirus Covid-19: conociendo al causante de la pandemia. The Biologist, 18(1).

18. He, J., Tao, H., Yan, Y., Huang, S. Y. and Xiao, Y. 2020. Molecular mechanism of evolution and human infection with SARS-CoV-2. Viruses, 12(4):428.

19. He, F., Deng, Y. and Li, W. 2020. Coronavirus disease 2019: What we know? Journal of Medical Virology.

20. Li, F., Li, W., Farzan, M. and Harrison, S. C. 2005. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. Science, 309(5742):1864-1868.

21. Wysocki, J., Ye, M., Rodriguez, E., González-Pacheco, F. R., Barrios, C., Evora, K. et al. 2010. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: Prevention of angiotensin II–dependent hypertension. Hypertension, 55(1):90-98.

22. Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N. and Slutsky, A. S. 2020. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. Intensive Care Medicine, 1-5.

23. Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y. and Zhou, Q. 2020. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science, 367(6485):1444-1448.

24. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S. et al. 2020. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature, 1-6.

25. Shang, J., Wan, Y., Liu, C., Yount, B., Gully, K., Yang, Y. et al. 2020. Structure of mouse coronavirus spike protein complexed with receptor reveals mechanism for viral entry. PLoS pathogens, 16(3):e1008392.

26. Burkard, C., Verheije, M. H., Wicht, O., van Kasteren, S. I., van Kuppeveld, F. J., Haagmans, B. L. et al. 2014. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. PLoS pathogens, 10(11).

27. Yang, N. and Shen, H. M. 2020. Targeting the Endocytic Pathway and Autophagy Process as a Novel Therapeutic Strategy in COVID-19. International Journal of Biological Sciences, 16(10):1724.

28. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L. et al. 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. Nature Communications, 11(1):1-12.

29. Beniac, D. R., Devarennes, S. L., Andonov, A., He, R. and Booth, T. F. 2007. Conformational reorganization of the SARS coronavirus spike following receptor binding: implications for membrane fusion. PLoS One, 2(10).

30. Gutiérrez, M. and López, S. 2010. Mecanismos de entrada de virus: una manera de conocer a la célula. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 13(1):26-34.

31. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T. and Veesler, D. 2020. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Cell.

32. Song, W., Gui, M., Wang, X. and Xiang, Y. 2018. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. PLoS pathogens, 14(8): e1007236.

33. Hofmann, H. and Pöhlmann, S. 2004. Cellular entry of the SARS coronavirus. Trends in Microbiology, 12(10):466-472.

34. Xia, S., Zhu, Y., Liu, M., Lan, Q., Xu, W., Wu, Y. et al. 2020. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. Cellular & Molecular Immunology. 1-3.

35. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O. et al. S. 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science, 367(6483):1260-1263.

36. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G. and Decroly, E. 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. Antiviral Research, 176:104742.

37. Accinelli, R. A., Xu, C. M. Z., Yachachin-Chávez, J. M., Cáceres-Pizarro, J. A., Tafur-Bances, K. B., Flores-Tejada, R. G. et al. 2020. Covid-19: La pandemia por el nuevo virus SARS-CoV-2. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 37(2).

38. Lukassen, S., Chua, R. L., Trefzer, T., Kahn, N. C., Schneider, M. A., Muley, T. et al. 2020. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. The EMBO Journal.

39. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. and Pöhlmann, S. 2020. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. Molecular Cell.

40. Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A. and Pöhlmann, S. 2013. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. Antiviral Research, 100(3):605-614.

41. Follis, K. E., York, J. and Nunberg, J. H. 2006. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell–cell fusion but does not affect virion entry. Virology, 350(2):358-369.

42. Becker, G. L., Sielaff, F., Than, M. E., Lindberg, I., Routhier, S., Day, R. et al. 2010. Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. Journal of Medicinal Chemistry, 53(3):1067-1075.

43. Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. 1995. Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. Journal of Biological Chemistry, 270(47):28397-28401.

44. Thomas, G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3(10):753-766.

45. Zhang, T., Wu, Q. and Zhang, Z. 2020. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. Current Biology.

46. Li, X., Zai, J., Zhao, Q., Nie, Q., Li, Y., Foley, B. T. et al. 2020. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. Journal of Medical Virology.

47. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C. and Garry, R. F. 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nature medicine, 26(4):450-452.

48. Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H. et al. 2020. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. Nature:1-4.

49. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. and Li, F. 2020. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. Journal of virology, 94(7).

50. Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y. and Zhou, Q. 2020. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science, 367(6485), 1444-1448.

51. Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M. et al. 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. Cell.

52. Batlle, D., Wysocki, J. and Satchell, K. 2020. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? Clinical science, 134(5):543-545.

53. Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H. and Farzan, M. 2004. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. Journal of Biological Chemistry, 279(5), 3197-3201.

54. Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schäfer, W., Vey, M., Angliker, H. et al. 1994. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. Biochimie, 76(3-4):217-225.

55. Kacprzak, M. M., Peinado, J. R., Than, M. E., Appel, J., Henrich, S., Lipkind, G. et al. 2004. Inhibition of Furin by Polyarginine-containing Peptides Nanomolar inhibition by nona-D-arginine. Journal of Biological Chemistry, 279(35):36788-36794.