



APLICACIONES DE LA CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN PRODUCCIÓN DE VACUNAS CONTRA EL SARS-COV-2

Fredy Sánchez

Laboratorio de Nanocaracterización.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

ORCID.org/0000-0001-6367-2056

sanfredi@gmail.com

Venezuela

Recibido: 27/03/2020 - Evaluado:17/04/2020

RESUMEN

Este ensayo tiene como objetivo discutir los modelos de propuestas de vacunas contra la SARS-CoV-2 utilizando técnicas de Crio-TEM. Para ello se fundamenta en las ideas de Humberto Fernández-Moran cuando decía, *"le llegó su hora a las biomoléculas"*, su Criomicroscopía Electrónica de Transmisión (Crio-MET) pasó de ser una técnica engorrosa y descriptiva, a ser fácil, estructural y más apropiada para los estudios de las macromoléculas en suspensión a alta resolución cercano al nivel atómico. Después de 50 años las técnicas propuestas y desarrolladas por este ilustre vene-

zolano, son hoy en día vigente y de gran importancia ya que han servido de base a nuevas áreas de estudio como la farmacología molecular basadas en estos principios biofísicos. El Dr. Fernández-Moran logró predecir que "a temperaturas de Helio líquido (-180 °C) y alta velocidad de congelamiento, se podrían analizar estructuras biológicas a alta resolución y en estado dinámico e hidratado libre de cristales de hielo". La Criomicroscopía Electrónica de Transmisión (Crio-MET) es un método biofísico que se emplea para el estudio de biomoléculas y complejos moleculares congelados-hidratados a resoluciones cercanas al nivel atómico. Esta técnica trajo

consigo la apertura de nuevas investigaciones en Farmacología Molecular. Su aplicación en el estudio y diseño de anticuerpos moleculares han sido exitosos en la formulación de nuevos fármacos de alta especificidad sin la producción de los conocidos efectos secundarios. Hoy en día la Farmacología Molecular ha logrado grandes avances en la posible producción vacunas de enfermedades infecto contagiosas que afectan a la humanidad.

Palabras Clave: Criomicroscopía Electrónica de Transmisión; COVID-19; Vacunas, Fármacos, Coronavirus



Applications of Electronic Cryomicroscopy in Production of Vaccines against SARS-CoV-2

ABSTRACT

This essay aims to discuss models of SARS-CoV-2 vaccine proposals using Cryo-TEM techniques. It is based on ideas Humberto Fernández Moran; when he said, "time has come for biomolecules", his Electronic Cryomicroscopy Transmission, (Cryo-TEM), went from being a cumbersome and descriptive technique to being easy, structural and more appropriate for studies of macromolecules in high resolution suspension close to atomic level. After 50 years the techniques proposed and developed by this illustrious Venezuelan, are today valid

and of great importance since they have served as a basis for new areas of study, such as molecular pharmacology based on these biophysical principles. Dr. Fernandez Moran managed to predict that "at liquid Helium temperatures (-180°C) and high freezing speed, biological structures could be analyzed at high resolution and in a dynamic and hydrated state free of ice crystals." Electronic Cryomicroscopy Transmission, (Cryo-TEM) is a biophysical method that is used to study biomolecules and frozen-hydrated molecular complexes at resolutions close to the atomic level. This technique brought with

it the opening of new research in Molecular Pharmacology. Its application in the study and design of molecular antibodies has been successful in the formulation of new high-specific drugs without the production of the known side effects. Today, molecular pharmacology has made great progress in the possible production of vaccines in infectious contagious diseases that affect humanity.

Key words: Cryo-Electron Microscopy; COVID-19; Vaccines, Drugs, Coronaviruses



Introducción

Este artículo trata de analizar las posibles vías de elaboración de vacunas basado en técnicas novedosas, que aunado al gran esfuerzo que se está realizando en otras áreas de la ciencia, podrían ser clave para mitigar los efectos de esta terrible enfermedad

Ante la presencia de la pandemia del coronavirus SARS-CoV-2, se han presentado varias estrategias para combatirlo basado en el conocimiento científico y las experiencias acumuladas de otras enfermedades infecto-contagiosas. El artículo se organiza en tres partes: a) Introducción; b) Concepto de Crimicroscopia electrónica donde se abordan un conjunto de estrategias o metodología que pueden contribuir a combatir el COVID 19; c) Conclusiones. Se presenta al final las referencias que sirvieron de apoyo para sustentar el trabajo.

Concepto de Crimicroscopia Electrónica y Técnicas para combatir el COVID 19

La Criomicroscopía Electrónica de Trasmisión (Crio-MET) es un método de biología estructural, el cual es utilizado para determinar la estructura tridimensional de biomacromoléculas (Benjin y Ling, 2019).

En las últimas décadas se han realizado grandes aportes revolucionarios a través de estudios de estructuras moleculares flexibles a niveles $\leq 3\text{\AA}$, que han dado un giro significativo en áreas como la biomedicina y en el diseño de fármacos moleculares como un inicio a la nueva medicina molecular (Wan y Col 2020; Don y Gao 2020, Wra pp 2020).

La prevención de enfermedades infecto-contagiosas como es actualmente el caso de COVID-19, de alta diseminación y

contagio, requiere no solamente de técnicas de detección rápida como es el uso de los test de diagnóstico rápido, sino también de la verificación con pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR) y la secuenciación de rendimiento que permiten el diagnóstico más preciso de la enfermedad (López, 2020).

Otra técnica, no menos importante, se refiere al estudio detallado de complejos moleculares a alta resolución lo cual ha sido posible gracias a los avances en las técnicas de Crio-MET.

Los criomicroscopios electrónicos de alta tecnología con voltajes de aceleración de 350 kV pueden capturar imágenes tipo fotogramas a muy alta velocidad, además de poseer un sistema de lentes electromagnéticas que favorece la visión de las muestras biológicas congeladas hidratadas y sin contrastantes químicos que afectaría la reso-



lución de la imagen. Conjuntamente están equipados con computadoras y software de reconstrucción de imágenes de hasta 15.000 fotogramas/min sustituyendo de esta manera a las técnicas clásicas de Cristalografía de rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Una de las ventajas de esta técnica (Crio-MET) en contraposición a las técnicas clásicas, es la posibilidad de analizar muestras a nivel de nanogramos.

En el ámbito de las investigaciones de la farmacología clásica, se ha cuestionado la multiplicidad de efectos colaterales que producen estos medicamentos en pacientes sintomáticos, como producto de la reacción en varios órganos blancos inespecíficos (Kolifarhood y Col 2020).

La terapia química contra los efectos del coronavirus hasta la fecha no ha sido totalmente efectiva, debido a que no se ha encontrado un agente antiviral específico disponible para combatir la infección por SARS-CoV-2 (López, 2020). Teniendo en cuenta que la pro-

pagación de SARS-CoV-2019 es cada vez mayor se está utilizando una alta variedad de fármacos pre-existente para combatir otras enfermedades infecto- contagiosas de manera de aminorar los efectos negativos sobre los pacientes infectados (Wan y col 2020). Entre los más utilizados se encuentran la Cloroquina, la Hidroxicloroquina, el interferón α y las distintas combinaciones de estos, entre otras posibilidades de tratamiento. (Devaux y col. 2020).

Ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la cloroquina junto a un antiviral denominado remdesivir, constataron que ambos podían inhibir al SARS-CoV-2 (Wang y col. 2020). Además, algunos investigadores sugieren que su capacidad para modular el comportamiento del sistema inmune puede permitirle mitigar las llamadas 'tormentas de citoquinas', potencialmente mortales (Lu, 2020). Otros trabajos recomiendan el uso de diferentes antivirales como el interferón α , el cual en algunos casos no ha sido eficaz, sin embargo, se ha reportado que

la combinación con hidroxiclo- roquina ha sido efectivo en algunos pacientes (Kolifarhood, 2020; Don y Gao, 2020).

Han surgido nuevas propuestas para producir la vacuna, sin embargo y según lo reportado hasta el momento, todavía el desarrollo de la vacuna se encuentra en la fase 1 y 2, además la validación por la Organización Mundial de la Salud (OMS) pudiera tardar varios meses y en ocasiones años (Barrantes, 2020).

Ante el avance progresivo de esta pandemia, se han realizado numerosas investigaciones en el área de la farmacología molecular por Crio-MET, que permite obtener la estructura molecular de los componentes macromoleculares que intervienen en la formación del complejo fármaco-blanco, para así lograr producir una vacuna en menor tiempo (Graham, 2019, Wall y col 2020). Es importante señalar que la cápside de los virus, se encuentra conformada por pentámeros, hexámeros y trímeros ("S").



De esta manera se mantiene la flexibilidad de la cápside, la protección de su material genético y la alta especificidad a la célula (Wan y Col 2020). La técnica más adecuada para estudiar la estructura del trómero del virus, se obtiene a partir de mapas de densidad electrónica desarrollados por la técnica de Crio-MET, donde se logran analizar los cambios conformacionales que ocurren en el trómero producto del congelamiento de la muestra y los fotogramas en número y alta velocidad (Wrap y Col 2020).

Los últimos avances en el diseño y fabricación de la vacuna contra la COVID-19, han permitido construir la estructura molecular del trómero "S" de la glicoproteína de la espiga ("S") del coronavirus a 3.5 Å de resolución. Dicho trómero es el responsable químico de la molécula de adhesión al receptor ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) con alta afinidad a la célula anfitriona. Otros hallazgos son los cambios conformacionales de la proteína "S" que se activan o no, en el proceso de unión del virus al

receptor celular. Esto indica que al inhibir el cambio conformacional en el trómero (virus), con anticuerpos (vacuna), el virus no reconocería el receptor de la célula (ACE2) anfitriona, y por consiguiente, no ocurriría la multiplicación de los virus (Wan y Col 2020; Ouyang 2020; Wrapp y Col 2020).

Otro aporte importante que ha generado el conocimiento de la estructura tridimensional de la glicoproteína de la espiga ("S") del SARS-CoV, ha sido la comprensión de los mecanismos de infección del virus, información que se utiliza para la producción de anticuerpos monoclonales a través del uso de liposomas (vesícula de lípidos) o bacterias con mRNA del virus, para la producción de la vacuna (Kumar,2020).

Conclusión

La aparición de esta nueva pandemia COVID-19 ha generado una gran cantidad de información con diferentes enfoques científicos, con el fin único de realizar hallazgos y pruebas que ayuden a diagnosticar y controlar esta enfermedad. La presencia de técnicas de Crio-MET y la reconstrucción tridimensional de imágenes a través de mapas de densidad electrónica de la estructura molecular ha revolucionado el diseño de fármacos y vacunas, ya que permitieron la identificación molecular del complejo proteico en el proceso infectivo, que interviene en el reconocimiento de las células anfitrionas o células blanco. Este aporte podría generar nuevos avances en la búsqueda de una vacuna molecular en un tiempo más corto y de allí la importancia de establecer grupos multidisciplinarios que establezcan protocolos integrados para lograr una mayor amplitud del conocimiento en la enfermedad.



REFERENCIAS

- Barrantes, F. J. (2020). While We Wait for a Vaccine Against SARS-CoV-2, Why Not Think About Available Drugs. En Red. Disponible en; doi: 10.20944/preprints202004.0087.v1
- Benjin, X. y Ling, L. (2019). Developments, applications and prospects of cryo-electron microscopy. *Protein Science*. En Red. Disponible en: doi.org/10.1002/pro.3805
- Devaux, C. A.; Rolain, J. M.; Colson, P. y Raoult, D. (2020). New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19. En Red. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857920300881>
- Dong, L.; Hu, S. y Gao, J. (2020). Discovering drugs to treat coronavirus disease. (2019) (COVID-19). *Drug discoveries & therapeutics*, 14(1), 58-60.
- Graham, B. S.; Gilman, M.S. y McLellan, J. S. (2019). Structure-Based vaccine antigen design. *Annual review of medicine*, 70, 91-104.
- Kolifarhood, G.; Aghaali, M.; Saadati, H. M.; Taherpour, N.; Rahimi, S.; Izadi, N. y Kumar, S. (2020). Drug and vaccine design against Novel Coronavirus (2019-nCoV) spike protein through Computational approach. En Red. Disponible en: doi: 10.20944/preprints202002.0071.v1
- López E. (2020). Coronavirus: la infección que apenas conocemos. Revista de Divulgación Científica "Los Ojos de la Ciencia" Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", 1(3) 16-30.
- Lu, H. (2020). Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Bioscience trends*, 14(1), 69-71.
- Ouyang, S. (2020). Cryo-electron microscopy structure of the SARS-CoV spike glycoprotein provides insights into an evolution of unique coronavirus spike proteins. En Red. Disponible en; doi: org/10.1101/2020.03.04.976258
- Wan, Y.; Shang, J.; Sun, S.; Tai, W.; Chen, J.; Geng, Q. y Zhou, Y. (2020). Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry. *Journal of virology*, 94(5). En Red. Disponible en **DOI:** 10.1128/JVI.02015-19
- Wang, M.; Cao, R.; Zhang, L.; Yang, X.; Liu, J.; Xu, M. y Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research*, 30(3), 269-271.
- Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C. L.; y McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263