

Aportaciones del laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología frente a la pandemia de COVID19

Ana C. Alcalá*, Daniel Barreto, Martha Contreras, Michelle Gutiérrez, Vanessa Hernández, Ana R. Pastor

*Todos los autores aportaron en igual medida a la elaboración de esta revisión.

El orden de aparición es estrictamente alfabético.

El trabajo fue autorizado por la Dra. Laura Palomares

Instituto de Biotecnología, UNAM

e-mail: acalcala@ibt.unam

Desde finales del año pasado, comenzamos a tener noticias de una enfermedad respiratoria que estaba atacando masivamente a la población de la lejana provincia de Wuhan en China, causando afecciones respiratorias en gran parte de la población y la muerte de otro tanto de forma acelerada. Un par de meses después, el agente causal de esta afección ya había sido identificado como el Coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo o SARS-CoV-2. Debido a su origen viral, esta enfermedad se denominó como la enfermedad causada por coronavirus reportada por primera vez en el año 2019 o por sus siglas COVID19. En cuestión de un par de meses, esta enfermedad ya se había diseminado en gran parte de la población mundial y 5 meses después todo el mundo ya se encontraba sumergido bajo los embates de esta inesperada afección. Debido a la alta incidencia de la COVID19, esta paso rápidamente a ser catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una pandemia. Las altas tasas de cuadros respiratorios graves que se presentaba en los pacientes afectados

rápidamente atraparon la atención de todos los entes de salud así como de la comunidad de científicos a nivel mundial, los cuales dejaron de lado sus investigaciones principales para aplicar su experiencia en tratar de entender todo lo relacionado con esta enfermedad. Así, se obtuvieron rápidos avances en relación al mecanismo de infección, la estructura exacta del virus, entre otros aspectos. El primer caso de COVID19 en México se reportó a finales del mes de febrero, desde ese entonces, el incremento sostenido en el número de casos nos asemejaba a otros países en los que la evolución de la pandemia se perfilaba como indetenible. Ante este panorama, en nuestro laboratorio decidimos que debíamos comenzar a aportar desde nuestra área de experiencia a la generación de bioherramientas que ayudaran a contender con la progresión de la COVID19 en el país. Motivados, nos enfocamos en 4 grandes áreas: desarrollo de un candidato vacunal, desarrollo de técnicas diagnósticas y producción de proteínas recombinantes del SARS-CoV-2. Estas tres áreas, dieron lugar al establecimiento de colaboraciones tanto con otros grupos de investigación como con

el sector empresarial. A continuación, ampliaremos brevemente en que consiste nuestro trabajo en cada una de estas áreas.

El Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología se encuentra ubicado en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la UNAM en la hermosa Ciudad de Cuernavaca en el Estado Morelos. Este laboratorio, liderado por la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera junto con el Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, está conformado por más de 30 personas entre los que se encuentran: 1 Investigador Asociado, 3 Técnicos Académicos, postdoctorantes, estudiantes de pre y postgrado pertenecientes a diferentes instituciones de nuestro país, así como de profesionistas de alto nivel contratados para ejecutar los convenios de colaboración que se establecen exitosamente desde hace muchos años con diferentes sectores de la industria biotecnológica. Es el foco principal de este laboratorio la biotecnología, en este se desarrollan diversos trabajos que contribuyen a fortalecer tanto el área académica como la industrial. Las líneas en las que se basa el trabajo en nuestro laboratorio comprenden: establecer estrategias para el mejoramiento de la producción de biomoléculas desde cultivo de células animales o de insecto, desarrollo y producción de candidatos vacunales para infecciones virales, desarrollo de metodologías diagnósticas, estudio del mecanismo de infección de diversos agentes virales, entre otros.

Desarrollo de un candidato vacunal

El SARS-CoV-2 tiene una tasa de mortalidad que va del 0.5 al 1%, es decir, de 5 a 10 personas mueren por cada 1000 habitantes. Sin embargo, estos porcentajes se incrementan en personas mayores de 65 años y en personas con enfermedades preexistentes como hipertensión, obesidad y diabetes, llegando a ser superior al 10%. Aunque, en comparación con otros virus respiratorios, la mortalidad que causa este virus es menor, su tasa de contagio es mayor, por lo que pudiera existir una alta cantidad de casos y personas transmisoras, dando como resultado que el número de muertes sea más alto. Por lo anterior, la necesidad de contar con una vacuna específica para este virus es imprescindible. Actualmente se están desarrollando diferentes tipos de vacunas en el mundo. Entre estas, están las basadas en la utilización del virus completo el cual es inactivado mediante métodos químicos o físicos para que no sea capaz de replicarse en el organismo, otras creadas a partir del material genético del virus o ARN y aquellas en las que mediante la tecnología del ADN recombinante se producen sólo las proteínas del virus o partes de estas, con las cuales se formula la vacuna. Este último tipo de vacunas se consideran más bioseguras ya que no se utiliza el virus nativo sino solo las proteínas estructurales para levantar una respuesta inmunitaria protectora en los individuos. En este sentido, la proteína spike (S) que conforma la superficie de las partículas del SARS-CoV-2, ha sido descrita y caracterizada como la proteína más idónea para este tipo de vacunas debido a que esta es la responsable de estimular la

producción de anticuerpos capaces de neutralizar al virus así como de interactuar con moléculas receptoras ubicadas en la superficie de las células de diferentes órganos como: pulmón, riñones, células sanguíneas, corazón, hígado y tracto gastrointestinal para que luego el virus pueda ingresar y replicarse en estas. La región que reconocen las moléculas receptoras en la proteína S se denomina región de unión al receptor o RBD. A través de la RBD, la proteína S hace contacto de manera específica con el receptor ACE2 el cual es ubicuo en los órganos ya mencionados, por lo que el virus tiene una amplia variedad de células donde reproducirse. Adicionalmente, este dominio RBD ha sido ampliamente caracterizado y se conocen en detalle los aminoácidos que intervienen en la interacción entre la RBD y el ACE2. ¿Y por qué es importante para nosotros conocer específicamente cuáles son los aminoácidos involucrados en esta unión?. Por un lado, debido a que secuencias cortas de estos aminoácidos representan epítomos naturales que podrían estimular la producción de anticuerpos neutralizantes y, por otro, debido a que conociendo a los aminoácidos que hacen contacto con el receptor ACE2, se pudiera producir uno o varios anticuerpos específicos que reconozcan y bloqueen esta unión. Debido a que en nuestro laboratorio contamos con amplia experiencia expresando y produciendo vacunas recombinantes basadas en la producción de proteínas o expresando pequeños péptidos, comenzamos a trabajar en el diseño y producción de una vacuna recombinante basada en la utilización de pequeños

péptidos de la RBD. Para lograr esto, hemos seleccionado mediante análisis computacionales, pequeños péptidos con tamaños de entre 15 y 24 aminoácidos. Debido a su pequeño tamaño, estos péptidos pudieran no funcionar adecuadamente como estimulantes eficientes del sistema inmune y además, su estabilidad podría verse comprometida. Para solventar estos inconvenientes, estos péptidos se expresaron en una plataforma que permite el despliegue eficaz de péptidos pequeños y a su vez sirve de vehículo que estimula de manera eficiente la respuesta inmune. Esta plataforma son las cápsides de virus adenoasociados (VAA). De manera breve, la cápside de virus VAA está formada por las proteínas VP1, VP2 y VP3, que se ensamblan de manera simétrica, formando una estructura de forma icosaédrica. Dentro de la secuencia de aminoácidos de estas tres proteínas, existe una región donde es posible la inserción de péptidos o epítomos de interés y éstos pueden ser desplegados en los vértices de este icosaedro. De esta manera, podemos tener decenas de copias de los péptidos en cada vértice y presentarlos de manera eficiente al sistema inmune. Para la producción de cápsides con el despliegue de péptidos se utilizan cultivos de células de insecto y un vector viral recombinante, llamado baculovirus (BV), que contiene los genes de las proteínas estructurales de VAA con la inserción de los péptidos de interés. Las células de insecto son cultivadas e infectadas con los BV recombinantes. Una vez que se verifica la producción de las partículas de VAA, se purifican y son utilizadas para la inmunización de ratones con la finalidad de

comenzar a evaluar si este candidato vacunal es capaz de desencadenar una respuesta inmune específica frente a los péptidos desplegados en este sistema. Estas primeras evaluaciones en ratones se conocen como fase preclínica, en la que el principal objetivo es caracterizar si hay una adecuada producción de anticuerpos además de identificar si existen reacciones secundarias o efectos tóxicos en los animales con la finalidad de medir la seguridad y eficacia de la vacuna. Actualmente, nuestro candidato vacunal en sus diferentes versiones, se encuentra siendo evaluado en esta fase preclínica. Aunque aún nos quedan retos importantes por enfrentar en el proceso de evaluación de esta vacuna, contamos con el compromiso, esfuerzo y conocimiento de un equipo de personas altamente capacitadas con el que esperamos avanzar de manera positiva hacia la formalización de esta propuesta vacunal.

Desarrollo de técnicas diagnósticas para la detección de la infección reciente o pasada por SARSCoV-2.

Durante esta pandemia de COVID-19, se torna muy importante identificar si las personas son portadoras de una infección activa, si no lo son o ya lo fueron. Determinar cualquiera de estos tres estatus en la población permite hacer el seguimiento clínico de pacientes, control epidemiológico, además conocer estadísticas que permitan entender y predecir el comportamiento de la enfermedad. Una de las propuestas de nuestro grupo de investigación junto con el apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología

del Estado de Morelos, fue trabajar en un método para detección en suero de anticuerpos específicos que se producen frente a la presencia del SARSCoV-2 como un proceso de defensa natural de nuestro organismo. Una vez que nuestro sistema inmunitario reconoce la presencia de agentes extraños como el SARSCoV-2 o algunas de sus proteínas, este es capaz de producir unas moléculas llamadas anticuerpos, los cuales serán actores importantes en el proceso de protección frente al virus ya que pueden actuar como moléculas neutralizantes de virus y causar la inhibición de la infección. Debido a que algunos tipos de anticuerpos pueden permanecer por mucho tiempo en el organismo o bien ser producidos como defensa frente a una segunda infección por células de memoria, estos también pueden protegernos de reinfecciones total o parcialmente. Aunque tanto la duración como la capacidad protectora de los anticuerpos frente al SARS-CoV2 aún permanecen en estudio, si tenemos la certeza de que se producen anticuerpos de dos clases. Estas clases de anticuerpos son los IgM e IgG. Los IgM son los primeros anticuerpos que genera el organismo, se presentan en circulación por cortos periodos de tiempo generalmente entre 7 y 14 días, por lo que identificar estos anticuerpos es de gran utilidad cuando se desea diagnosticar una infección activa o muy reciente. Por otra parte, los IgG aparecen en etapas tardías de la enfermedad, generalmente después de la segunda semana del contacto con el virus. Sin embargo, estos anticuerpos permanecen en el organismo durante algunos meses y pueden utilizarse para la

identificación de personas que ya padecieron la enfermedad. Aprovechando esta generación de anticuerpos IgM e IgG dirigidos al SARS-CoV-2 en etapas diferentes en el contexto de la infección, se desarrolló una técnica para su identificación denominada: “ensayo de inmuoadsorción ligado a enzimas” o mejor conocido como ELISA. El ensayo propuesto, es una adaptación del método publicado previamente por el grupo de investigación del Dr. Florian Krammer de la Escuela de Medicina Icahn del Hospital Monte Sinai de Nueva York. Este ELISA está dividido en dos fases: la primera, es una prueba de escaneo, en la que es posible evaluar un número considerable de muestras e identificar pacientes presuntos positivos y la segunda, en la que se realiza una prueba confirmatoria que proporciona información sobre el título o la cantidad de anticuerpos presentes en el paciente. El análisis, se realiza fijando a la proteína RBD del virus como antígeno viral a una placa de ELISA. Posteriormente, se colocan las muestras del suero obtenido de la sangre de los pacientes. Si un paciente tuvo contacto con el virus SARS-CoV-2 y presenta anticuerpos, estos se unirán a la RBD. A continuación, es retirada la muestra de los pacientes para eliminar con ella los anticuerpos inespecíficos no unidos y se coloca un anticuerpo secundario. Este anticuerpo puede ser de dos tipos de acuerdo su especificidad, aquel que reconoce los anticuerpos de clase IgM o de IgG. Estos anticuerpos secundarios están unidos a una enzima que en presencia de un sustrato adecuado generara una reacción colorimétrica que puede ser cuantificada

utilizando un dispositivo electrónico. Dentro de las consideraciones que se incorporaron para la ejecución de esta técnica, se contempla la inactivación del virus SARS-CoV-2 en las muestras mediante calor previo a su manipulación, para así brindar seguridad a quien la ejecuta. Como ventajas, el ELISA desarrollado es una técnica diagnóstica de bajo costo, ya que la proteína RBD utilizada es producida en nuestro laboratorio y los resultados son obtenidos para una gran cantidad de muestras en menos de 48 horas. Sin embargo, se encuentra limitada a los niveles de anticuerpos, los que resultan variables entre individuos. Para efectos de la evaluación de este ELISA, se ensayaron muestras de pacientes positivos y negativos (gentilmente donadas por los doctores Constantino López del Instituto Mexicano del Seguro Social y Jesús Martínez del Instituto Nacional de Salud Pública y el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, previamente analizadas mediante la técnica molecular de referencia, la transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), mediante la cual se determina la presencia del virus en las muestras. Como resultado de la evaluación, se obtuvieron altos niveles de especificidad y sensibilidad, lo que le otorga confiabilidad al ELISA para el diagnóstico de infecciones en curso o pasadas. La aplicación principal de esta prueba no solo se limitará a la determinación del estatus presente o pasado de una infección por SARSCoV-2, sino además será utilizada para hacer un seguimiento a lo largo del tiempo en la población para conocer la duración de la circulación de los

anticuerpos luego de la infección. Adicionalmente podrá ser aplicada para monitorear la respuesta de anticuerpos en pacientes luego de la aplicación de una vacuna.

Producción de proteínas recombinantes del SARS-CoV2 como bioherramientas.

Con la finalidad de ser utilizadas en el ELISA descrito anteriormente y haciendo uso de nuestra amplia experiencia en la producción de proteínas recombinantes, nos dedicamos a la producción de las proteínas RBD y S. Para la producción de estas proteínas, utilizamos la tecnología del ADN recombinante la cual nos permite inmovilizar el gen que porta la información necesaria para que estas proteínas puedan ser producidas sin necesidad de manipular el virus. En particular, la secuencia de ADN que expresará ambas proteínas virales es integrada en un tipo de vehículo llamado plásmido el cual facilita que el material genético sea introducido a las células para que, con la maquinaria celular se produzcan las proteínas. Los plásmidos utilizados con las secuencias genéticas de tanto de la proteína S como de la RBD fueron donados por el Dr. Florian Krammer (Hospital Monte Sinaí, Nueva York, EUA). Para la expresión de estas proteínas, se pueden escoger distintos tipos de células provenientes de diferentes organismos (mamíferos, insectos, bacterias). En nuestro caso, dado que era necesario que ambas proteínas conservaran algunas modificaciones luego de que son producidas, como por ejemplo, la adición de ciertos tipos de glicanos o azúcares, escogimos algunos tipos celulares que generan patrones de

glicosilación similares a los de humanos. La expresión de estas proteínas en las líneas celulares escogidas se realizó de dos maneras: transitoria y estable. Para la expresión transitoria, se utilizó la línea celular de riñón de embrión humano (HEK293T) donde la proteína se produce de manera temporal en un lapso de entre 48-72 horas. Este tipo de expresión genera un bajo rendimiento de proteína debido a que la cantidad de plásmido que generará a las proteínas recombinantes que puede ser introducido a la célula también es baja. Para la expresión estable, se utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO) las cuales son crecidas en suspensión para generar una mayor producción de las proteínas RBD y S debido a que las concentraciones celulares que se alcanzan son mayores y adicionalmente sus costos de mantenimiento son bajos. En esta modalidad, se manipula el plásmido a ser insertado para que, al ser introducido en las células, este sea capaz de insertarse en el genoma de las células de manera estable y de esta manera lograr que se produzcan las proteínas de interés de manera continua por mucho tiempo. Para la expresión de ambas proteínas (S y RBD) optamos por realizar ambos tipos de expresión, aunque la producción a gran escala se lleva a cabo utilizando el sistema estable. Para cubrir otras fuentes de obtención de las proteínas S y RBD, estandarizamos otro sistema de expresión de proteínas recombinantes denominado sistema célula de insecto-baculovirus, el cual es ampliamente utilizado en nuestro laboratorio. En este sistema se utiliza un virus llamado baculovirus que naturalmente infecta insectos y otros

invertebrados. En este sistema, el material genético de interés se inserta en el genoma modificado del virus generando así un virus recombinante que al infectar a la célula de insecto, expresa la proteína. Este sistema al igual que las células CHO presenta la ventaja de ser fácilmente escalable dado que ambos tipos celulares crecen en suspensión.

Colaboración con empresas y otros grupos de investigación

Nuestro grupo de investigación se ha caracterizado por tener una estrecha relación con las empresas farmacéuticas para el desarrollo de procesos basados en cultivos de células procariotas, eucariotas inferiores y superiores durante más de 20 años. Cuando se presentó la pandemia del COVID-19 el grupo de investigación estaba involucrado en proyectos de desarrollo de estrategias racionales de producción de proteínas multiméricas las cuales tienen un importante potencial como vacunas contra diversos virus (rotavirus e influenza) y en el desarrollo de bioprocesos para la producción de proteínas humanas recombinantes. Nuestro grupo ha establecido colaboraciones con el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública, en un proyecto que tiene como objetivo la identificación y producción de anticuerpos monoclonales humanos anti-SARS-CoV2 con potencial terapéutico y profiláctico. La participación de nuestro grupo consiste en el desarrollo del proceso de producción y caracterización exhaustiva de estos anticuerpos. Por otra parte, establecimos una importante colaboración

con el Laboratorio Nacional para la producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB) con el objetivo de validar métodos de rápidos de diagnóstico, novedosos o mejorados para la detección tanto del SARS-CoV-2 como de los anticuerpos que se generan frente a este.

Por último y no menos importante, es necesario mencionar que en los diferentes proyectos de investigación, así como en las diferentes colaboraciones mencionadas en el presente artículo se contempla en todo momento la formación de recursos humanos altamente especializados, lo que sin duda redundará en el fortalecimiento de la planta científica y técnica capaces de aportar en los diferentes campos de acción de la biotecnología. La ocurrencia de esta pandemia generada por la circulación del SARS-CoV-2 en la población, nos ha hecho replanificar todas nuestras actividades y priorizar aquellas que estén enfocadas en ayudar a contender con esta crisis sanitaria. Sin embargo, a la par estamos ganando una experiencia invaluable como grupo de investigación biotecnológica en el que estamos comprometidos en mejorar cada vez más nuestros procesos para que alcancen los estándares de calidad más altos tanto a nivel nacional como internacional y de esta manera poder ofrecer desarrollos y procesos que contribuyan a contender con esta crisis sanitaria y a su vez sentar las bases que nos permitan estar preparados para hacer frente, desde nuestra amplia área de especialidad, a futuras emergencias de la manera más rápida y eficiente posible.