



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**“Biología estructural y computacional en el diseño
de vacunas”**

Autor: Rosario Bueno Uceda

Fecha: Febrero 2020

Tutor: Dña. M^a Concepción Civera Tejuca

ÍNDICE

RESUMEN	- 3 -
INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
BIOLOGÍA ESTRUCTURAL	- 4 -
OBJETIVOS.....	- 5 -
MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 5 -
RESULTADOS	- 6 -
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTÍGENOS.	- 6 -
MÉTODOS	- 7 -
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	- 7 -
Cristalografía de rayos-X	- 8 -
Criomicroscopía electrónica	- 8 -
Cristalografía de rayos-X vs. crio-ME	- 10 -
AVANCES EN LA ENFERMEDAD DEL CÓLERA POR LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL.....	- 10 -
Toxina colérica: estructura y mecanismo de acción	- 11 -
Intervenciones, tratamiento y profilaxis actual	- 14 -
Vacunas anticoléricas orales.....	- 14 -
Nuevos horizontes	- 14 -
DISCUSIÓN	- 16 -
CONCLUSIONES.....	- 18 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 18 -

RESUMEN

El desarrollo de nuevas vacunas ha sido partícipe en la búsqueda de antígenos y sus respectivos epítomos. En consecuencia, han surgido nuevas técnicas que permiten realizar una búsqueda más efectiva y rápida.

El mapeo de epítomos y la vacunología reversa han demostrado ser dos herramientas de gran peso para el diseño de vacunas. Además, se ha demostrado la gran importancia que suponen los avances en bioinformática para el desarrollo de estas técnicas.

La resonancia magnética nuclear, la cristalografía de rayos-X y la criomicroscopía electrónica son los métodos empleados por la biología estructural para obtener modelos tridimensionales que proporcionen una mejor comprensión de cómo las moléculas interactúan con el medio y cómo participan en distintos procesos biológicos.

En la enfermedad del cólera, tomada como ejemplo en este trabajo, se han dilucidado la estructura de la toxina y el mecanismo de acción con gran precisión. En base a esta información, se han planteado diferentes maneras de abordar la enfermedad de forma más eficiente.

INTRODUCCIÓN

La vacunación es una de las intervenciones sanitarias con mejores resultados en la historia de la humanidad, llegando a prevenir más de 2.5 millones de muertes al año (1). Su impacto en la salud es tal que, con la excepción de la potabilización del agua, ninguna otra actuación, ni siquiera el uso de antibióticos, ha tenido tan gran efecto en la reducción de la mortalidad y el crecimiento de la población (2).

Las vacunas son un método económico de protección frente a enfermedades infecciosas (3), habiendo conseguido la erradicación completa o casi completa de muchas enfermedades en los países desarrollados (2).

Sin embargo, y a pesar de los avances tecnológicos acontecidos en las últimas décadas, las enfermedades infecciosas siguen siendo una causa importante de muerte y deterioro económico alrededor de todo el mundo. Según el Estudio de Carga Mundial de Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo llevado a cabo en 2010, las patologías infecciosas eran responsables del 18.5% de todas las muertes humanas y del 40% del total de años de vida perdidos durante ese año (4).

Se considera que la historia de la vacunación comenzó con el experimento de Edward Jenner en 1796, en el que inoculó el virus de la viruela bovina procedente de una pústula de una ordeñadora a un niño de 8 años. Con esto evidenció que el contacto con el virus de la viruela bovina había protegido al niño de contraer la enfermedad (1).

El siguiente avance en vacunación fue conseguido por Louis Pasteur, asentando bases tan importantes como la atenuación, la modificación por pases repetidos y la necesidad de reemplazar la vacunación “persona a persona” con algo más seguro, más consistente y menos peligroso. Desde entonces, la ciencia ha proporcionado muchos avances al campo de la vacunología, permitiendo así su desarrollo y continuidad (2).

Según la OMS, una vacuna es cualquier preparación destinada a producir inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos (5). La vacuna ideal

consistiría en la administración de una sola dosis, sin efectos secundarios y consiguiendo una protección de larga duración (2).

A continuación mencionaremos los tipos más significativos. Según la naturaleza de la vacuna, podemos encontrar:

- Vacunas vivas o atenuadas: contienen microorganismos vivos que infectan al huésped de una forma similar a cómo ocurre en la infección natural, por ello, los microorganismos han de estar necesariamente atenuados (2). Es posible la reversión de los mismos a su forma patógena por tanto, no se recomienda su uso en población susceptible. Proporcionan una inmunidad de larga duración (2,6).
- Vacunas inactivadas: los microorganismos contenidos en estas vacunas no pueden multiplicarse y se caracterizan por ser mejor toleradas. En contraposición, la inmunidad proporcionada es de menor duración y por ello suelen combinarse con componentes adyuvantes (6). Suele requerirse la administración de dosis múltiples, a veces seguidas de dosis de recuerdo (2).
- Vacunas de subunidades proteicas: este tipo de vacunas no emplea microorganismos enteros; si no antígenos de superficie altamente purificados, proteínas puras, o incluso toxoides (2,6).
- Vacunas conjugadas: consisten en la unión covalente de un inmunógeno concreto a una proteína portadora por métodos químicos. Con este proceso se pretende convertir antígenos débilmente inmunogénicos en inmunógenos altamente efectivos (2).
- Vacunas de ácidos nucleicos: el objetivo es transformar las células. Contienen ácidos nucleicos que codifican para un inmunógeno protector (2). Han de incorporarse a las células para que así éstas puedan sintetizar el antígeno. (6).

Los tres últimos tipos de vacunas aquí descritos requieren de avanzados métodos tecnológicos para su obtención. A continuación están recogidos algunos de ellos:

- Tecnología del ADN recombinante: se pretende modificar deliberadamente la información genética contenida en una célula (2), con el fin de introducir mutaciones que permitan aumentar la estabilidad de la atenuación, o incluso construir microorganismos recombinantes empleados como vectores (6).
- Bioinformática: el desarrollo de nuevos sistemas operativos ha hecho posible la predicción de estructuras biológicas macromoleculares implicadas en multitud de procesos en estudio (7).
- Vacunología reversa: este método permite la aproximación al desarrollo de vacunas partiendo de la información genómica. Predice qué antígenos tienen mayor posibilidad de servir como candidatos para el desarrollo de vacunas (2).
- Vacunología estructural: es una aproximación racional que pretende abordar las limitaciones de la vacunología reversa. Sus objetivos son mejorar la estabilidad y seguridad de los antígenos, así como identificar epítomos en los mismos (1). Utiliza como herramienta la **biología estructural**. De este modo, diseña racionalmente moléculas inmunógenas empleando la información estructural disponible (3).

BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

Disciplina dirigida al estudio de la estructura de las moléculas biológicas. Dentro de los objetivos de la biología estructural se incluyen la comprensión de cómo las distintas moléculas se relacionan con su entorno, cómo se mueven, cómo se reconocen entre sí y

cómo transmiten la información específica que se requiere para producir el efecto correspondiente (8).

Particularmente, esta técnica tiene un papel muy importante en la caracterización estructural de antígenos y en la descripción de las interacciones antígeno-anticuerpo (1).

La biología estructural emplea técnicas como son la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), la difracción de rayos X y la criomicroscopía electrónica. Dichas técnicas están experimentando continuamente nuevos desarrollos tecnológicos que permiten su aplicación al estudio de distintos problemas de importante interés biológico y biomédico (8).

Actualmente, la estructura de la mayoría de antígenos y sus correspondientes epítopos, puede ser determinada y empleada en el diseño de nuevas vacunas y fármacos.

Así, surgió el Protein Data Bank (PDB), el cual fue establecido en 1971 y comenzó con únicamente siete entradas. A día de hoy, casi 50 años después, lo componen un total de más de 100.000 estructuras macromoleculares (1). No hay mejor ejemplo para mostrar el increíble desarrollo que estas técnicas están experimentando.

OBJETIVOS

En este trabajo vamos a realizar una revisión bibliográfica de los avances aportados por la biología estructural al diseño de nuevas vacunas. Para ello, estableceremos las bases de esta disciplina, y estudiaremos de qué herramientas dispone. Asimismo, analizaremos la situación actual en la que se encuentra el diseño de vacunas; explicando algunos de los nuevos métodos que emplea.

Una vez hayamos comentado todo lo anterior, profundizaremos en el contexto de una de las enfermedades infecciosas con más repercusiones en el tercer mundo, el cólera, exponiendo cuáles han sido las aportaciones de la biología estructural y qué frutos han dado.

MATERIAL Y MÉTODOS

El contenido de esta memoria consiste en una revisión bibliográfica elaborada a partir de publicaciones y artículos seleccionados mediante el buscador *Google Scholar*.

Al tratarse de un tema de actualidad, existía información aún en proceso de ser publicada, dificultando así la recopilación de bibliografía. Por este motivo, una de las estrategias que llevé a cabo fue buscar primero en la ficha técnica correspondiente el contenido de distintas vacunas ya comercializadas, para después dirigirme al PDB y encontrar o no su estructura.

- **PDB**: se trata de un portal on-line abierto al público en general que permite explorar el mundo de las proteínas y los ácidos nucleicos. Contiene miles de estructuras 3D disponibles de forma gratuita para el público en general.

A continuación, procedí a la descarga del fichero correspondiente a la estructura molecular de interés, para así poder trasladarla al programa MOLMOL.

- **MOLMOL**: es un programa de gráficos moleculares que permite mostrar, analizar y manipular las estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas.

Con este programa fui capaz de orientar la estructura tridimensional de la molécula según mi criterio, con el fin de mostrar mejor aquellas secciones que buscaba destacar.

Finalmente, he empleado el programa Mendeley para organizar toda la bibliografía recopilada en una biblioteca personal.

- **Mendeley**: se trata de una guía de referencia y una red social académica que pretende mejorar la organización del investigador, colaborar con otros investigadores vía online y descubrir las publicaciones más actualizadas.

RESULTADOS

Para el diseño y desarrollo de nuevas vacunas, han de emplearse técnicas como:

- La **vacunología reversa (RV)**: permite el descubrimiento de nuevos inmunógenos a partir de bases de datos genómicas proporcionadas por la bioinformática (3). Tradicionalmente, estas moléculas eran seleccionadas en base a datos experimentales, cantidad e inmunogenicidad (1). Además de suponer un enorme ahorro de tiempo, permite la identificación de antígenos imposibles de determinar por métodos tradicionales (1,2).
- La **vacunología estructural (SV)**: el conocimiento de las estructuras biomoleculares ha proporcionado nueva información para el diseño de inmunógenos. Las estructuras cristalizadas de antígenos con uno o más epítomos suponen el punto de partida para el diseño de moléculas inmunógenas (3).

Con el fin de cumplir con los objetivos establecidos por la vacunología estructural, es necesario llevar a cabo procesos de caracterización de antígenos. Además, la optimización y diseño de los mismos supone aún hoy en día, un importante desafío para esta técnica (1).

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTÍGENOS.

Como se ha indicado anteriormente, la estructura de la mayoría de antígenos y sus correspondientes epítomos, puede ser determinada y empleada en el diseño avanzado de nuevas vacunas a día de hoy. Al mismo tiempo, la determinación de las estructuras correspondientes a los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) proporciona información trascendental para la comprensión de las interacciones patógeno-huesped acontecidas.

Para llevar a cabo la caracterización estructural de dichas moléculas es necesario efectuar un proceso conocido como mapeo de epítomos o “epitope mapping”. Se trata de un método experimental a partir del cual se obtiene información sobre las regiones exactas de un determinado antígeno que son reconocidas y con las que interaccionan los anticuerpos. Desempeña un papel muy importante en los primeros estadios del diseño de vacunas. Algunas de las ventajas que proporciona esta técnica son:

- **Focaliza la respuesta inmune**: si seleccionamos únicamente aquellos epítomos que dan lugar a una mayor protección, estamos indicando, indirectamente, al sistema inmunitario frente a qué epítomos ha de crear anticuerpos.

- Mejora la inmunidad: no todos los epítomos de un patógeno tienen la misma capacidad inmunogénica. Con este método podemos encontrar los epítomos clave para desencadenar una respuesta inmune neutralizante y efectiva.
- Evita el empleo de epítomos indeseables: como aquellos similares a proteínas nativas del huésped.
- Reducción de costes: puesto que no es necesario cultivar grandes cantidades de patógenos, la producción de nuevas vacunas resulta ser menos complicada, más segura y barata a largo plazo.

Aunque actualmente no exista ninguna vacuna comercializada que haya basado su desarrollo en la caracterización estructural de epítomos, se cree que las ventajas inherentes al empleo de esta técnica serán adecuadamente valoradas en un futuro muy próximo (9).

A pesar de los muchos avances y del importante papel que desempeña el mapeo de epítomos, podemos encontrar dificultades aún no resueltas. Algunos de los retos a los que se enfrenta esta técnica hoy día son:

- Antígenos con alta variabilidad secuencial
- Conseguir una adecuada homogeneidad y estabilidad
- Optimizar la presentación de epítomos (1).

Además, los métodos computacionales más comunes de predicción de epítomos se basan en la secuencia de aminoácidos, y están especializados en predecir las estructuras de epítomos de naturaleza lineal. Sin embargo, la mayoría de epítomos son conformacionales, suponiendo esto un reto en la predicción estructural de los mismos. (1).

MÉTODOS

Existen distintos métodos disponibles para llevar a cabo el mapeo de epítomos. A continuación, vamos a tratar la metodología experimental utilizada en el mapeo de epítomos por la biología estructural.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Constituye la única alternativa para estudios tridimensionales en disolución, evaluación de identidad y cuantificación de principios activos. Se trata de una técnica con un amplio y reconocido espectro de aplicaciones en el campo del análisis estructural.

El fenómeno de resonancia plantea que los núcleos (^1H , ^{13}C y ^{15}N principalmente) sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en el orden de las radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno químico de los núcleos, el espectro de señales de absorción revelará información trascendental sobre la estructura de la molécula (10).

La aplicación de esta técnica en la caracterización de vacunas de naturaleza glicosacáridica o glicoproteica es muy amplia. Sobre ella recaen procesos tan importantes como los análisis asociados a la producción y a los controles de calidad de los intermedios de síntesis y los reactivos residuales.

La RMN ha presentado dificultades desde sus inicios para realizar evaluaciones cuantitativas de principios activos e impurezas de vacunas. Uno de los factores principales responsables de esta limitación era la existencia de diferentes tiempos de relajación para cada núcleo analizado. Se denomina tiempo de relajación al margen de

tiempo necesario para la recuperación del equilibrio tras la presencia de un pulso magnético externo (11).

Sin embargo, el desarrollo de numerosas herramientas ha ido corrigiendo lo anterior y haciendo posible el desarrollo de la RMNc (resonancia magnética nuclear cuantitativa). Esta técnica se ha establecido como una alternativa que permite cuantificar con resultados fiables aún cuando otros métodos de tipo espectrofotométricos o cromatográficos no han podido proporcionar una adecuada precisión (10,12).

A pesar de ser un método más costoso, presenta muchas ventajas. Algunas de ellas vienen recogidas a continuación:

- Permite optimizar parámetros para cuantificar biomoléculas de elevada complejidad.
- No requiere necesariamente la destrucción o transformación de la muestra.
- Puede emplear diferentes núcleos, como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N y ^{19}F .
- Posibilita la descomposición de la señal en caso de que esta esté solapada con otras.
- Permite la separación en el espectro final de los componentes estudiados. (10).

Cristalografía de rayos-X

Se trata de una de las principales herramientas de la biología estructural en el mapeo de epítomos (1). Proporciona una imagen clara y definida a nivel atómico de la estructura del epítomo.

Para determinar la estructura, es preciso que las proteínas de interés formen cristales. Posteriormente, se irradian rayos-X, los cuales se dispersan en contacto con la muestra, dando lugar a un patrón de difracción que queda reflejado en el dispositivo detector. Con la información proporcionada por el patrón de difracción, se puede deducir la estructura de la muestra problema.

A pesar de que la cristalografía de rayos-X ha sido la mejor herramienta de la biología estructural, presenta importantes limitaciones (13).

La principal limitación que debemos tener en cuenta es la dificultad para transformar determinadas proteínas en estructuras cristalinas que sean adecuadas para poder someterse a análisis. Esta notable dificultad radica en que el proceso de cristalización de proteínas se caracteriza por:

- Requerir grandes cantidades de muestra
- Incertidumbre a cerca de la calidad del cristal que pueda proporcionar la muestra
- Imposibilidad de predecir el tiempo necesario para el proceso, pudiendo no llegar a conseguirse nunca.

Como consecuencia de estas limitaciones, la cristalografía de rayos-X no puede ser considerada como el método universal en el mapeo de epítomos (1).

Por lo tanto, en los últimos años, una nueva técnica ha comenzado a desbancar a dicho método, solventando las dificultades con las que los investigadores se encontraban. Se trata de la criomicroscopía electrónica.

Criomicroscopía electrónica

Esta técnica consiste en el empleo de un dispositivo capaz de utilizar haces de electrones para fotografiar biomoléculas congeladas y así, dejar al descubierto su estructura. Fue desarrollada en la década de los 80 y 90.

Es capaz de formar modelos moleculares de alta resolución de muestras imposibles de analizar mediante cristalografía de rayos-X. Asimismo, permite revelar la compleja maquinaria celular, mostrando cómo moléculas involucradas en patologías podrían llegar a ser moduladas por fármacos (13).

El principio en el que se basa la reconstrucción tridimensional de proteínas mediante criomicroscopía electrónica (crioME) es el siguiente: si se consiguen obtener imágenes de proyección de una proteína o complejo macromolecular en diferentes direcciones, estas pueden servir para calcular su estructura tridimensional (14).

Cuando se quiere determinar la estructura de un complejo macromolecular empleando este método, se debe preservar la muestra de tal forma que quede protegida frente a las condiciones de alto vacío del microscopio y frente al daño por radiación ejercido por el haz de electrones que incide en ella. Así es como surgió el proceso de vitrificación o congelación a alta velocidad, el cual fue desarrollado a mediados de los años 80 (14).

Durante estos años, un avance muy importante fue la utilización de etano líquido como principal criógeno (13).

Los resultados obtenidos con esta técnica representan una imagen fidedigna de la estructura atómica de la muestra. Gracias a este proceso podemos atrapar las proteínas en su estado nativo e hidratado, aislar estados conformacionales de vida muy corta y determinar la estructura de proteínas tal y como son en solución.

Uno de los principales problemas con los que nos encontramos al emplear esta técnica es el daño por radiación de la muestra. Para evitar esto se intenta iluminar el menor tiempo y con la menor dosis posible, en consecuencia, se disminuye el contraste y la relación señal/ruido de la imagen final.

Hoy en día, se emplean detectores directos de electrones (DDD). Estos aparatos aumentan mucho la eficiencia y la calidad de detección de la señal. Permiten tomar decenas de “fotogramas” por segundo y por tanto, corregir las posibles distorsiones producidas (14).

A la hora de procesar las imágenes es necesario seguir los siguientes pasos:

1. Corrección de los “defectos” de las imágenes generadas.
2. Extracción, clasificación y selección de las partículas de interés.
3. Generación de un modelo inicial: se lleva a cabo la comparación de las imágenes obtenidas de la muestra con las proyecciones de un modelo. Esta reconstrucción se toma como nuevo modelo y se repite el proceso hasta que se resuelve la estructura.
4. Determinación de la heterogeneidad presente en la muestra: esta técnica permite determinar la estructura de diferentes estados conformacionales de una misma proteína o complejo que se encuentran mezclados en la muestra.
5. Refinamiento y obtención de la o las estructuras finales: se sigue un proceso iterativo en el que cada vez las direcciones de proyección son calculadas con mayor precisión. Algunos de los factores que determinan el resultado son: la flexibilidad y tamaño de la muestra; y distintos aspectos técnicos (14).

Cristalografía de rayos-X vs. crio-ME

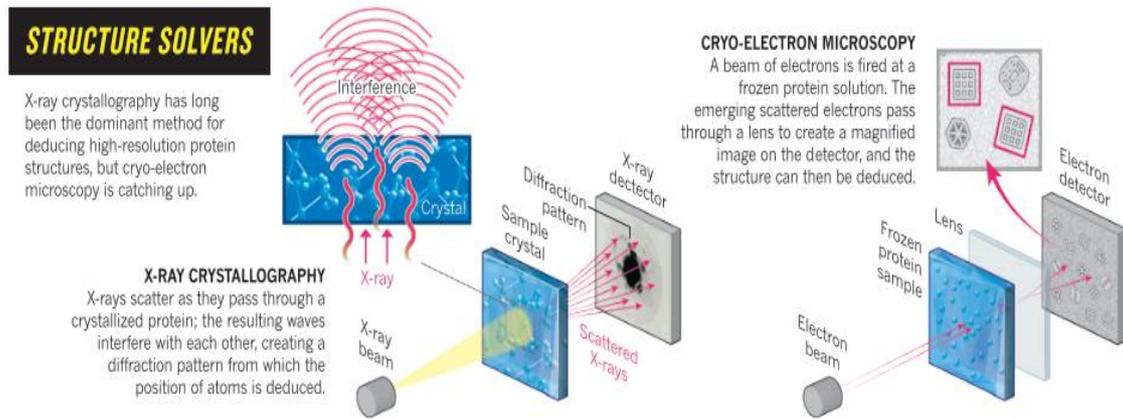


Fig. 1: Comparación entre cristalografía de rayos-X y criomicroscopía electrónica (13).

A diferencia de la cristalografía de rayos-X, la criomicroscopía electrónica emplea muy poca cantidad de muestra y no precisa de cristalización. De este modo, es posible congelar la muestra en diferentes conformaciones con el fin de deducir los mecanismos que rigen su funcionamiento. También, se ha visto que este nuevo método es capaz de analizar moléculas realmente pequeñas, pudiendo llegar a proporcionar modelos estructurales precisos de moléculas con un tamaño de hasta 2.2 Å (13).

Con el fin de mostrar el gran alcance de la biología estructural, en este trabajo vamos a hacer una revisión bibliográfica de cómo esta disciplina ha contribuido al conocimiento y al desarrollo de nuevas profilaxis para enfermedades tan importantes como el cólera.

AVANCES EN LA ENFERMEDAD DEL CÓLERA POR LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados con el bacilo *Vibrio cholerae*. Su reservorio original se encuentra en el delta del Ganges, aunque desde el siglo XIX se ha propagado a otros lugares del mundo. Constituye un indicador de inequidad y falta de desarrollo social (15).

La infección puede transmitirse de persona a persona como consecuencia de una mala higiene, de un acceso limitado a los procesos de saneamiento o debido al empleo de suministros de agua contaminados. De esta forma, se contribuye a la propagación de la enfermedad, dando lugar a la aparición de brotes.

Durante el brote, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda llevar a cabo una respuesta rápida y eficaz que permita reducir la mortalidad y la morbilidad (16).

Cabe destacar que, de todos los serogrupos de *V. cholerae*, solo dos causan brotes epidémicos: O1 y O139 (15).

Este microorganismo es una bacteria gram negativo con forma de “bastón” curvo (bacilo), responsable de la aparición de cerca de 2.9 millones de casos de cólera al año y aproximadamente de 95.000 muertes anuales. Tal magnitud se debe a la presencia de dos factores de virulencia de gran importancia:

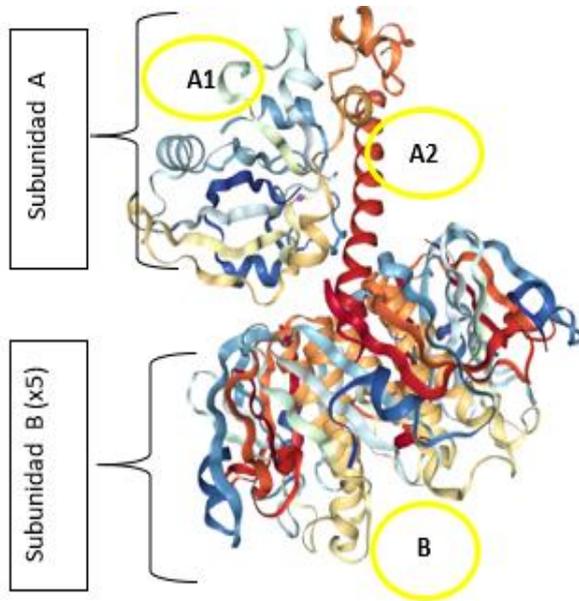
- CT (toxina colérica): su paso a través de la pared del enterocito produce la aparición de esa diarrea acuosa aguda tan característica y peligrosa.
- TCP (pili corregulados con la toxina): participa en la colonización de la mucosa intestinal del huesped.

V. cholerae es capaz de formar biofilms (forma de vida no móvil) como método de protección y diseminación a otros reservorios (17).

Toxina colérica: estructura y mecanismo de acción

V. cholerae tiene la capacidad de producir una holotoxina heterohexamérica (AB₅) como principal factor de virulencia. Dicha toxina presenta una subunidad A a la cual se unen cinco subunidades B. Ambos tipos de subunidad son sintetizados en el citosol.

La toxina colérica es secretada al exterior de forma activa a través de Eps (extracellular protein secretion) y proteínas Gsp. Está formada por un pentámero simétrico compuesto de cinco subunidades B idénticas que se colocan dejando un poro central. En contraposición, la subunidad A la conforman a su vez dos dominios diferentes:



- A1: presenta el sitio enzimático. Para que este sea activo se requieren una serie de uniones covalentes entre el dominio A1 y A2.

- A2: compuesto por una α -hélice y una "cola" que se extiende a través del poro formado por las cinco subunidades B.

La interacción entre la subunidad A y las subunidades B tiene lugar gracias al dominio A2 y a la formación del poro (18).

La molécula está formada por un único polímero de 240 residuos. Se encuentra unida a dos ligandos: ion sodio y β -D-galactosa.

Fig. 2: Holotoxina heterohexamérica (AB₅) difracción de rayos X.PDB ID: 1S5E (21).

En la Figura 2 podemos apreciar las distintas subunidades: en la porción superior vemos la subunidad A, compuesta a su vez por un dominio A1 el cual está integrado por α -hélices y hojas β -laminar plegadas, y A2 cuya estructura viene definida por una α -hélice de longitud considerable que conecta con la subunidad B de la molécula a través del poro central.

Por otro lado, en la porción inferior encontramos el pentámero B de la toxina, formado por cinco subunidades B idénticas.

En este caso, la imagen proviene de la toxina colérica producida por *V. cholerae* serotipo O1.

A continuación, se adjunta la secuencia estructural total de la molécula:

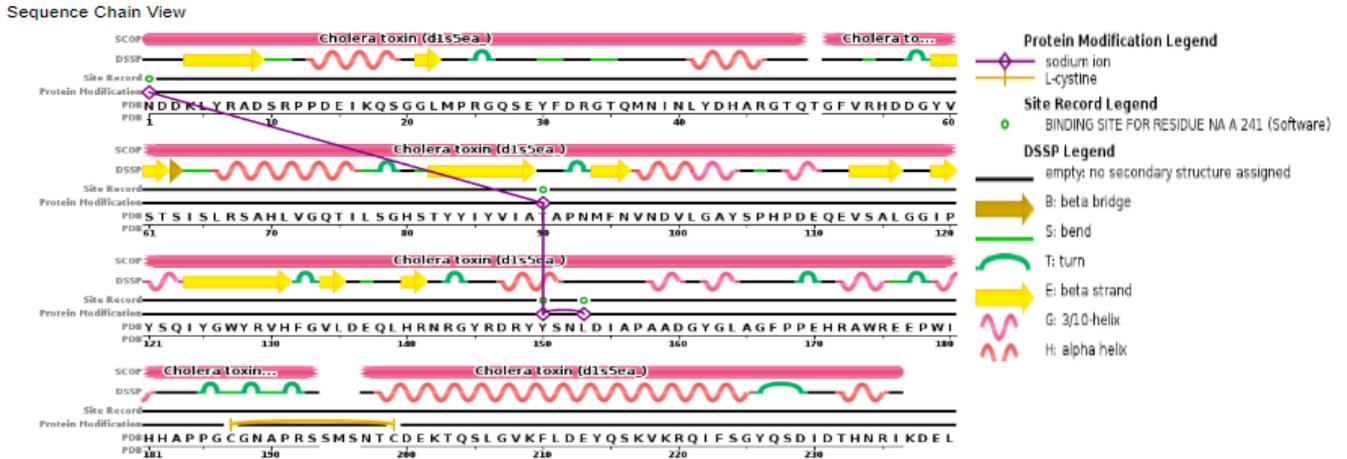


Fig. 3: Esquema secuencial de la estructura de la toxina colérica.

Tras una serie de cambios conformacionales en la molécula, se produce una escisión proteolítica y una reducción de un enlace disulfuro. En consecuencia, se cree que estos mecanismos inducen la activación enzimática del dominio A1 de la subunidad A (18).

Con el fin de realizar un análisis en profundidad de la subunidad B, es necesario orientar la molécula, facilitando así su observación y estudio.

Como se observa en la Figura 5, la subunidad B de la toxina colérica, está formada por cinco unidades B idénticas, dando lugar a un pentámero. Esta estructura se dispone de tal manera que deja un espacio vacío en el centro, es decir, da lugar a un poro el cual tendrá una función imprescindible en el mecanismo de acción de la toxina.

Cada unidad B está formada por hojas β -laminar plegadas que quedan hacia fuera y por α -hélices las cuales se disponen hacia el interior de la molécula. Asimismo, cada unidad B presenta un sitio de unión al receptor, gangliósido GM-1, presente en los enterocitos del individuo y será de gran importancia para el mecanismo de acción de la toxina.

A continuación, se adjunta la secuencia estructural total de la subunidad B de la toxina colérica:

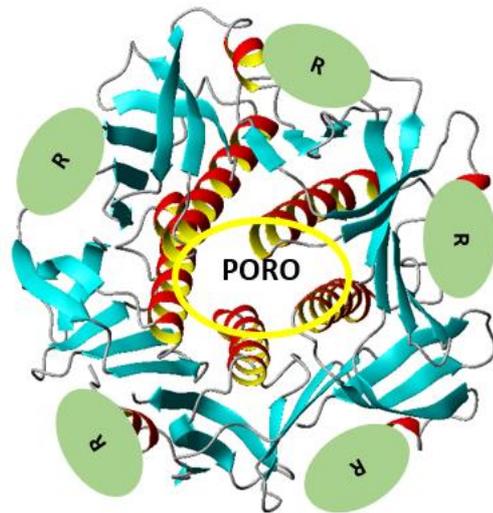


Fig. 4: Subunidad B de la toxina colérica producida por *V. cholerae* O1, obtenida por difracción de rayos X. Imagen creada con el programa MOL-MOL. PDB ID: 1FGB (22).

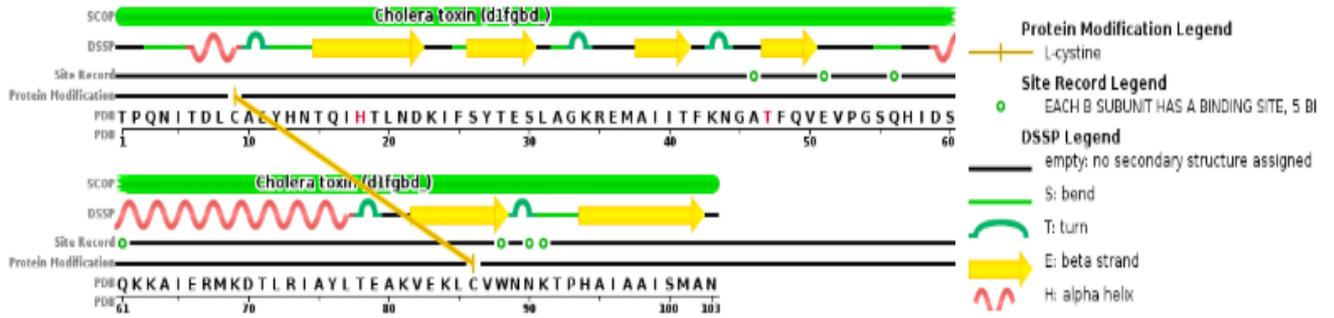


Fig. 5: Esquema estructural del pentámero B de la toxina colérica.

Una vez que ya conocemos la estructura de la toxina colérica, vamos a abordar su **mecanismo de acción**.

Las subunidades A y B de la toxina se sintetizan en el citosol del microorganismo para después ser translocadas al espacio periplásmico propio de las bacterias Gram negativas. Este espacio se encuentra entre la membrana plasmática y la membrana externa de la bacteria, y es aquí donde se produce el ensamblaje de la toxina: una subunidad A se une a cinco subunidades B, dando lugar a la holotoxina hetero-hexamérica (AB₅).

Una vez que el ensamblaje ha tenido lugar, las toxinas son secretadas activamente a través de la membrana externa bacteriana. En este proceso participan proteínas de secreción extracelular (Eps) y del sistema SEC (General Secretion Pathway “Gsp”).

Tras la ingesta de la bacteria por medio de agua o alimentos contaminados, en el lumen intestinal del hospedador, el pentámero B reconoce al receptor GM-1 y se ensambla a él a través de los distintos sitios de unión al receptor. El receptor GM-1 es un gangliósido que se encuentra en la superficie de la membrana celular de los enterocitos. La unión del pentámero B al receptor provoca la endocitosis de la subunidad A de la toxina mediante una serie de mecanismos muy complejos que aún hoy en día no se conocen bien.

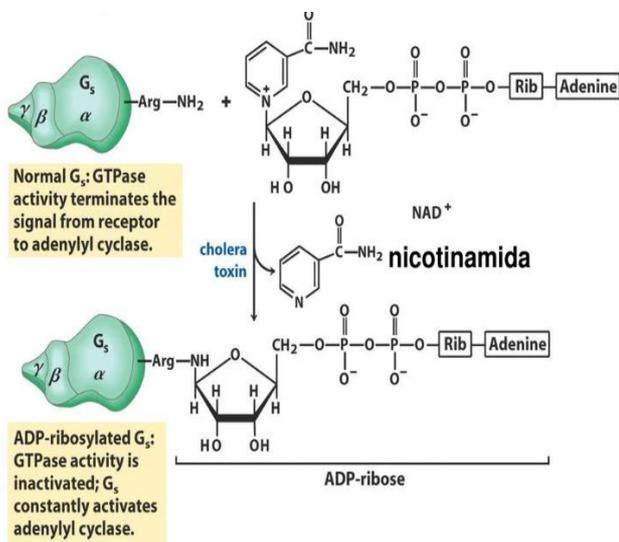


Fig. 6: Inactivación de proteína G por ADP-ribosilación inducida por toxina colérica (23).

Tras esta reacción, se libera una molécula de nicotinamida a la vez que la subunidad G_sα queda ADP-ribosilada en el residuo Arg 201. Como consecuencia, se bloquea la acción GTPasa de la proteína G_s (deja de responder a estímulos hormonales normales), estimulando así, de forma continua, a la adenilato ciclasa y por tanto, incrementando constantemente la concentración de cAMP intracelular.

En el citoplasma del enterocito, la subunidad A se disocia, quedando libre el dominio A1. Este presenta actividad enzimática y por ello es el responsable de la ADP-ribosilación.

En la Figura 6, podemos ver un esquema de la reacción enzimática llevada a cabo por la subunidad A1 de la toxina colérica.

Tras esta reacción, se libera una molécula de nicotinamida a la vez

Las altas concentraciones de AMPc conllevan un drástico eflujo de moléculas de agua e iones tales como Na⁺ y Cl⁻. Este hecho es el que, en última instancia provoca la aparición de diarreas acuosas agudas (18).

Intervenciones, tratamiento y profilaxis actual

A pesar de los avances científicos, la situación actual del cólera sigue siendo preocupante. Con el fin de frenar el avance de la enfermedad, hoy en día contamos con los siguientes recursos:

- Suministro de agua potable y saneamiento: son fundamentales para controlar la transmisión del cólera y de otras enfermedades transmitidas por el agua. Algunas de las medidas tomadas incluyen: cloración, intervenciones en el ámbito doméstico o mejora de los sistemas de eliminación de aguas residuales.
- Vacunas anticoléricas orales.
- Antibióticos: su uso racional acorta la duración del proceso diarreico, reduce el volumen de líquidos de rehidratación necesarios y disminuye la magnitud y duración de la excreción fecal de *V. cholerae*.
- Terapias de rehidratación: oral en pacientes que presenten una deshidratación moderada o intravenosa en el caso de que la deshidratación sea grave (15).

Vacunas anticoléricas orales

Como podemos ver a continuación, actualmente disponemos de cuatro vacunas anticoléricas orales:

Tabla 1: Vacunas anticoléricas orales comercializadas

	Sanchol	Euvichol	Dukoral	Vaxchora
Serogrupos	O1 y O139	O1 y O139	O1	O1
Nº dosis	2	2	2	1

Todas ellas, a excepción de la última y más moderna, precisan de la toma de dos dosis espaciadas en el tiempo (unas 2 semanas) para conseguir la máxima eficacia; por ello, en caso de epidemia, el empleo de este tipo de vacunas no resulta demasiado eficaz ya que se requiere rapidez (19).

Por el contrario, Vaxchora es una vacuna viva o atenuada contra *V. cholerae* serogrupo O1, que requiere la administración de una única dosis.

Vaxchora es la única vacuna disponible en USA. Fue aprobada en junio de 2016 por la FDA y se emplea en adultos de entre 18-64 años que vayan a viajar a zonas afectadas por la enfermedad. Se trata de una reformulación de otra vacuna (Orochol) la cual fue retirada del mercado por problemas de sostenibilidad empresarial en 2003.

Se formuló a partir de técnicas de DNA recombinante: partiendo del serogrupo O1 Classical Inaba de *V. cholerae*, se retiró el 94% de la subunidad A de la toxina permitiendo así la síntesis de la subunidad B no toxigénica (20).

Nuevos horizontes

Gracias a los avances en el conocimiento de la estructura de la toxina colérica y de cómo es capaz de producir los agudos síntomas de la enfermedad, podemos destacar diferentes dianas a la hora de desarrollar un nuevo fármaco:

Proceso de ensamblaje: Inhibición

Como se ha comentado con anterioridad, este proceso tiene lugar en el periplasma de la bacteria, donde una subunidad A se une a cinco subunidades B dando lugar a una holotoxina hetero-hexamérica AB₅. Para ello, han de producirse interacciones entre el extremo C-terminal del dominio A2 y las subunidades B del pentámero.

En base a todo esto, podría diseñarse una molécula de pequeño tamaño que llegara hasta el periplasma y estableciera interacciones con el poro de la subunidad B. De esta forma, competiría con la subunidad A y se inhibiría la formación de la toxina.

Se ha visto que existe un área hidrofóbica que rodea la parte superior del poro de la subunidad B la cual tiene un papel fundamental en el correcto posicionamiento de la subunidad A durante el ensamblaje. Dicho área ha sido considerado como un farmacóforo y se ha comenzado a buscar potenciales candidatos para la inhibición.

Uno de ellos sería la molécula MDT (3-metiltio-1,4-difenil-1H-1,3,4-triazolio), de la cual se piensa que en un futuro se podrán obtener inhibidores que taponen el poro “pore-plug” mediante cristalografía estructural (18).

Unión del pentámero B con el receptor GM-1: Bloqueo

Para que la toxina entre en la célula intestinal mediante endocitosis, es necesario que, previamente, el pentámero B haya interactuado con el receptor gangliósido GM-1, concretamente con la cabeza polar de oligosacáridos (GM1-os). Se describe esta unión como “two-fingered grip”, lo cual podríamos entender como “tipo pinza”. Con cuantos más receptores GM1-os interactuase el pentámero B, más fuerte será la unión.

En ella intervienen dos residuos terminales: galactosa (Gal) y ácido siálico (NeuAc).

- El residuo de galactosa tiene un papel fundamental en la especificidad de la reacción y se une a un “bolsillo profundo” de la holotoxina.
- La unión con el ácido siálico no es tan potente.

El desarrollo de posibles **antagonistas** aumentó enormemente desde que se conoció la estructura de la toxina colérica en los años 90. La estrategia preferida ha sido emplear el residuo de galactosa como un anclaje para el diseño de moléculas prometedoras como MNPG (m-nitrofenil- α -D-galactopiranosido).

Últimamente, se están intentando conseguir antagonistas multivalentes (18,19). Para su diseño se aprovechó la estructura simétrica del pentámero B y se intentó imitar la unión “two fingered grip” mediante ligandos pentavalentes. Dichos ligandos están constituidos por un núcleo pentavalente, del cual salen cinco prolongaciones flexibles. Se demostró que la longitud de las prolongaciones era un factor crítico para la afinidad de la unión.



Fig. 7: Ligando decavalente unido al pentámero B de la toxina colérica, formando una estructura tipo “sandwich” (24).

Por otro lado, ligandos decavalentes fueron estudiados y se observó cómo se disponían en “modo sandwich” o “sandwich arrangement” con dos pentámeros B (18). Sin embargo, el desarrollo de estas moléculas resulta aún hoy en día demasiado caro. Con el fin de solventar este problema, se planteó diseñar **análogos** de GM1-os. En concreto, se buscaron estructuras no hidrolizables, explorando opciones tales como:

- Galactósidos simples (componente número 1)
- Ligandos bidentados (componentes 2 y 3): obtenidos a partir de la unión de una galactosa con un residuo de N-sialiltriazol (19).

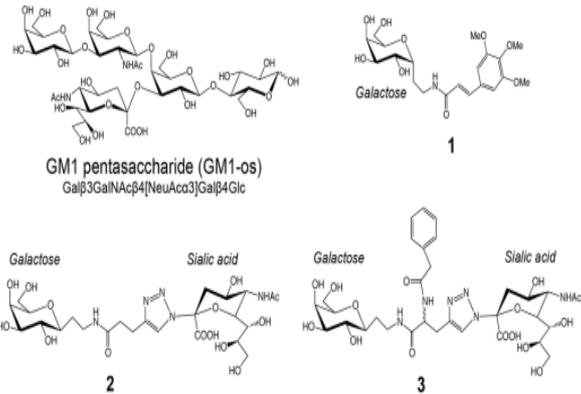


Fig. 8: Representación esquemática del pentasacárido GM-1 e inhibidores 1-3 (19).

Con el propósito de estudiar las uniones y la fuerza con la que se establecen, se crearon complejos entre las moléculas anteriores (1-3) y tres homólogos de toxina colérica (cCTB, ET-CTB y pLTB) para después obtener, mediante cristalización, imágenes de alta resolución de los mismos. Se obtuvieron los resultados que aparecen en la Tabla 2:

Tabla 2: Resumen de los resultados obtenidos tras la formación de los complejos

	ET-CTB + 1	cCTB / ET-CTB + 2	pLTB + 3
Interacciones con los sitios de unión al receptor	En 2 de los 5 sitios	En TODOS los sitios	En TODOS los sitios
Unión de Gal al “bolsillo profundo”	EFICAZ	EFICAZ	EFICAZ
Unión con el verdadero receptor	IMPEDIDA	IMPEDIDA	IMPEDIDA
Dimerización	NO	NO	SÍ

En los tres casos, la unión con el verdadero receptor no se produce o se lleva a cabo en menor medida, disminuyendo así las consecuencias fatales de la toxina en el organismo.

Cabe destacar que, en dos de los sitios de unión, el compuesto 3 conseguía establecer uniones adicionales con otros dos pentámeros B adyacentes. Por lo tanto, los ligandos se disponían de forma transversal.

La capacidad de dimerización mostrada por el análogo 3 resulta muy interesante ya que se cree que en casos de infección, la agregación de la toxina soluble ayudaría frente a la acumulación de fluidos (19).

DISCUSIÓN

A día de hoy existen aún numerosas enfermedades infecciosas que nos amenazan; afectando, especialmente, a países en vías de desarrollo. El cólera es una de esas enfermedades infecciosas. Dada la importante repercusión que producen los brotes de

cólera en los países subdesarrollados, es necesario encontrar un nuevo tratamiento o profilaxis que mejore la situación.

Ya hemos visto que, de todas las vacunas comercializadas, solo una de ellas no requiere más de una dosis. Por ello, en caso de emergencia, no resultan demasiado eficaces (19).

La biología estructural ha contribuido a determinar la estructura de la toxina colérica. Este conocimiento ha facilitado el desarrollo de posibles nuevos tratamientos, entre los que destacamos aquellos encaminados a inhibir el proceso de ensamblaje y los que pretenden bloquear la unión con el receptor GM-1 (18,19).

Por otro lado, parece que el desarrollo de vacunas anticoléricas más eficaces resulta complejo puesto que los nuevos avances se centran especialmente en la búsqueda de un tratamiento, no en el desarrollo de nuevas profilaxis. Sea como fuere, en caso de encontrar indicios que conduzcan a nuevos y más potentes antígenos, contaremos con las herramientas proporcionadas por la biología estructural y computacional.

El proceso por el que se diseñan nuevas vacunas es aún muy complejo. Los patógenos desarrollan mecanismos para evadir la respuesta inmune (9). Es por este motivo que se necesita emplear la vacunología reversa y el mapeo de epítomos.

No obstante, estas técnicas dependen del desarrollo de nuevos softwares capaces de procesar y almacenar tal cantidad de información. La bioinformática cobra protagonismo de la mano de la vacunología estructural. Resulta imprescindible el desarrollo de nuevos sistemas operativos capaces de predecir de forma fiable qué epítomos darán un mejor resultado en el proceso de inmunización.

La variabilidad antigénica que presentan algunos microorganismos como el virus de la gripe *Influenzavirus A* o *B*, también supone un reto para el desarrollo de vacunas eficaces. En este caso, gracias al empleo de la biología estructural, hemos podido conocer con detalle la estructura de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. De esta forma, se están intentando diseñar nuevos preparados vacunales que contengan únicamente la sección más constante de la cola de esta molécula (1).

Hemos visto que la biología estructural utiliza como principales herramientas técnicas como la RMN, la cristalografía de rayos-X y la criomicroscopía electrónica. De un tiempo a esta parte, la criomicroscopía electrónica está desplazando a la cristalografía de rayos-X, técnica que durante mucho tiempo fue el principal recurso de la biología estructural (13). Ya son muchos los profesionales que abogan por la superioridad de la crio-ME frente a la cristalografía de rayos-X. No solo ha demostrado ser capaz de obtener modelos estructurales fiables de moléculas realmente pequeñas, si no que ha solventado las limitaciones que presentaba la cristalografía de rayos-X.

Por otro lado, la crio-ME es una técnica mucho más cara. Con el fin de hacer la crio-ME más accesible, en países como EEUU o UK, se han desarrollado distintos métodos que permiten a los investigadores acceder al criomicroscopio electrónico por medio de un sistema de reservas (13). De esta manera, si un grupo de investigadores necesita emplear el aparato, puede solicitarlo.

Con respecto a la RMN, en las últimas décadas se ha perfeccionado la RMNc, importante recurso para solventar muchos de los problemas analíticos comúnmente encontrados en la fabricación de vacunas (10).

CONCLUSIONES

Las enfermedades infecciosas aún amenazan millones de vidas en todo el mundo, alcanzando una mayor repercusión en países en vías de desarrollo. Entre ellas, encontramos el cólera, enfermedad para la cual se han desarrollado vacunas orales. No obstante, estos preparados no resultan eficaces en situaciones de emergencia (19,20). Tras conocer la estructura de la toxina colérica y su mecanismo de acción, se ha avanzado en el desarrollo de nuevas vacunas y/o tratamientos.

Para desarrollar nuevas vacunas se emplean métodos como son el mapeo de epítomos, la vacunología reversa o la vacunología estructural. Del mismo modo, es necesario realizar avances en el campo de la bioinformática.

Las principales herramientas de la biología estructural han sido la RMN y la cristalografía de rayos-X. La técnica de RMN ha demostrado ser capaz de realizar procesos de cuantificación de forma fiable. Por otro lado, las limitaciones de la cristalografía de rayos-X han dado paso a una nueva técnica: la criomicroscopía electrónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Liljeroos L, Malito E, Ferlenghi I, Bottomley MJ. Structural and Computational Biology in the Design of Immunogenic Vaccine Antigens. *J Immunol Res.* 2015;2015.
2. Criado MT, Sánchez S, Ferreirós CM. Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(9):564–72.
3. Kulp DW, Schief WR. Advances in structure-based vaccine design. *Curr Opin Virol.* 2013;3(3):322–31.
4. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2095–128.
5. OMS | Vacunas [Internet]. [cited 2019 Dec 29]. Available from: <https://www.who.int/topics/vaccines/es/>
6. García F. Métodos moleculares para el desarrollo de vacunas. *Acta pediátr costarric.* 1999;13(2):55–9.
7. Pal SK, Bandyopadhyay S, Ray SS. Evolutionary computation in bioinformatics: A review. *IEEE Trans Syst Man Cybern Part C Appl Rev.* 2006;36(5):601–15.
8. Pendry J. Industria e investigación Los retos de la Biología estructural. 2016.
9. Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Freund NT, Weiss Y. Epitope Mapping. *BioDrugs.* 2007;21(3):145–56.
10. Garrido R, Vélez H, Vérez V. Resonancia magnética nuclear: Nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *Vaccimonitor.* 2013;22(1):35–42.
11. Beyer T, Diehl B, Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy of biologically active substances and excipients. *Bioanal Rev.* 2010;2(1):1–22.
12. Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC. Quantitative ¹H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod.* 2005;68(1):133–49.
13. Callaway E. The revolution will not be crystallized: A new method sweeps

- through structural biology. *Nature*. 2015 Sep 9;525(7568):172–4.
14. Determinación estructural mediante criomicroscopía electrónica de partículas individuales y procesamiento de imágenes | *Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular* | SEEBM [Internet]. [cited 2020 Jan 7]. Available from: <https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=596&url=determinacion-estructural-mediante-criomicroscopia-electronica-de-particulas-individuales-y-procesamiento-de-imagenes>
 15. Cólera [Internet]. [cited 2019 Dec 26]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cholera>
 16. Taylor DL, Kahawita TM, Cairncross S, Ensink JHJ. The impact of water, sanitation and hygiene interventions to control cholera: A systematic review. *PLoS One*. 2015;10(8):1–19.
 17. Yoon S hun, Waters CM. *Vibrio cholerae*. *Trends Microbiol*. 2019;27(9):806–7.
 18. Fan E, O’Neal CJ, Mitchell DD, Robien MA, Zhang Z, Pickens JC, et al. Structural biology and structure-based inhibitor design of cholera toxin and heat-labile enterotoxin. *Int J Med Microbiol*. 2004;294(4):217–23.
 19. Heggelund JE, Mackenzie A, Martinsen T, Heim JB, Cheshev P, Bernardi A, et al. Towards new cholera prophylactics and treatment: Crystal structures of bacterial enterotoxins in complex with GM1 mimics. *Sci Rep*. 2017;7(1):2326–2326.
 20. Cabrera A, Lepage JE, Sullivan KM, Seed SM. Vaxchora: A Single-Dose Oral Cholera Vaccine. *Ann Pharmacother*. 2017;51(7):584–9.
 21. O’Neal CJ, Amaya EI, Jobling MG, Holmes RK, Hol WGJ. Crystal Structures of an Intrinsically Active Cholera Toxin Mutant Yield Insight into the Toxin Activation Mechanism. *Biochemistry*. 2004;43(13):3772–82.
 22. Zhang RG, Westbrook ML, Westbrook EM, Scott DL, Otwinowski Z, Maulik PR, et al. The 2.4 Å crystal structure of cholera toxin B subunit pentamer: Choleragenoid. *J Mol Biol*. 1995;251(4):550–62.
 23. Nelson, David.L; Cox M. Toxinas producidas por las bacterias que causan el cólera y la tos ferina (pertussis). In: *Lehninger Principios de Bioquímica*. Cuarta edi. New York; 2005. p. 464.
 24. Zhang Z, Merritt EA, Ahn M, Roach C, Hou Z, Verlinde CLMJ, et al. Solution and crystallographic studies of branched multivalent ligands that inhibit the receptor-binding of cholera toxin. *J Am Chem Soc*. 2002;124(44):12991–8.