



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Potencialidades de la microscopía en la investigación del SARS-CoV-2: aislamiento, fisiopatogénesis y dianas terapéuticas

Viviana Falcón Cama^{1,7*} <https://orcid.org/0000-0002-3795-9966>
Giselle Pentón Rol^{1,7} <https://orcid.org/0000-0002-3719-7287>
Teresita de Jesús Montero González³ <https://orcid.org/0000-0003-3372-6791>
Nelson Acosta Rivero⁴ <https://orcid.org/0000-0001-8779-8358>
Gerardo Guillén Nieto^{1,7,8} <https://orcid.org/0000-0003-3098-0970>
Emilio Felino Acosta Medina^{6,7} <https://orcid.org/0000-0002-4259-7728>
Daina Cremata García¹ <https://orcid.org/0000-0002-9892-779X>
Mariuska Matos Terrero¹ <https://orcid.org/0000-0003-3330-7941>
Celia Fernández Ortega¹ <https://orcid.org/0000-0001-8973-3240>
Leonardo Oramas Díaz¹ <https://orcid.org/0000-0003-2829-2212>
Brian Mondeja Rodríguez⁶ <https://orcid.org/0000-0001-6196-3570>
Omar Reinaldo Blanco Águila² <https://orcid.org/0000-0003-0719-7232>
Anamary Suárez Batista⁵ <https://orcid.org/0000-0001-5555-8309>
Enrique Noa Romero⁵ <https://orcid.org/0000-0003-2656-0228>
Rodolfo Valdés Veliz¹ <https://orcid.org/0000-0002-5396-6509>
Angelina Díaz García^{6,8} <https://orcid.org/0000-0002-2514-4989>
Yorexis González Alfaro⁶ <https://orcid.org/0000-0002-0831-7972>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Habana, Cuba

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Sancti Spiritus, Cuba

³ Hospital Militar Central Dr. Luis Díaz Soto. Habana, Cuba

⁴ Centro de Estudio de Proteínas. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Habana, Cuba

⁵ Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Habana, Cuba

⁶ Centro de Estudios Avanzados, Habana, Cuba

⁷ Escuela Latinoamericana de Medicina. Habana, Cuba

⁸ Academia de Ciencia de Cuba

*Autor para la correspondencia: viviana.falcon@cigb.edu.cu

RESUMEN

Introducción: La identificación del amplio tropismo del SARS-CoV-2 puede ser crítico para la patogénesis viral, por lo que es relevante conocer los mecanismos de infección e identificar nuevas dianas terapéuticas. Esta investigación consta de 2 bloques experimentales: aislamiento y caracterización del virus SARS-CoV-2 y patogénesis, tropismo, dianas moleculares y terapéuticas. **Métodos:** Se realizaron los siguientes procedimientos a) de la cavidad nasofaríngea de pacientes positivos al COVID-19, se obtuvieron muestras clínicas que se inocularon en las células Vero E6 y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido a las 72 h postinfección; b) se obtuvieron muestras de órganos viscerales de fallecidos por COVID-19: pulmón, hígado, riñón y cerebro. Los criocortes o cortes ultra finos se evaluaron mediante la tinción de tricrómica de Masson, microscopía electrónica y la microscopía confocal. **Resultados:** Se obtuvieron los siguientes resultados principales: a) se identificó un extenso daño en las células Vero E6 infectadas en las cuales se pudieron observar partículas de virus y viriones

Revisores

Luis C Velázquez Pérez
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

extracelulares, evidenciando un efecto citopático; b) se identificaron procesos fisiopatológicos: por tinción de tricrómica de Masson, se identificó un predominio de las etapas más avanzadas del daño alveolar difuso, al microscopio electrónico en pulmón, se evidenció la pérdida abundante de las células epiteliales alveolares. A través de microscopía confocal, se detectó la presencia de la nucleocápside del SARS-CoV-2 colocalizada con las moléculas claves tales como: fibronectina, vimentina, PPARy conjuntamente con el inflammasoma NLRP3 en tejidos corticales cerebrales. Como conclusiones, en esta investigación: a) se realizó por primera vez el aislamiento del virus SARS-CoV-2 en Cuba en exudados nasofaríngeos de pacientes con COVID-19 en la línea celular Vero E6. b) Se identificó por primera vez; novedosos procesos celulares y fisiopatológicos involucrados en la infección del virus SARS-CoV-2 y potenciales dianas terapéuticas que revelan fármacos prometedores para combatir la COVID-19 y sus secuelas.

Palabras clave: microscopía; SARS-CoV-2; fisiopatogénesis; dianas; tropismo

Potential of microscopy in SARS-CoV-2 research: isolation, pathogenesis, and therapeutic targets

ABSTRACT

Introduction: The identification of the wide tropism of SARS-CoV-2 can be critical for viral pathogenesis, and it is therefore relevant to determine the infection mechanisms and identify new therapeutic targets. This study consists of two experimental blocks: a) isolation and characterization of the SARS-CoV-2 virus, and b) pathogenesis, tropism, and targets, both molecular and therapeutic.

Methods: The procedures used were the following: a) clinical samples were obtained from the nasopharyngeal cavity of COVID-19 positive patients, which were inoculated in Vero E6 cells and analyzed by Scanning Electron Microscopy 72 h after infection. b) They were obtained visceral organ samples (lung, liver, kidney and brain) from patients dyed from COVID-19. Cryocuts were prepared and evaluated by Masson's Trichrome Staining, Electron Microscopy and Confocal Microscopy. **Results:** Results show a) Extensive damage in infected Vero E6 cells where virus particles and extracellular virions are observed, displaying a cytopathic effect; b) They were identified Physio pathological processes using Masson's Trichrome Staining, detecting a predominance of the most advanced stages of Diffuse Alveolar Damage. Using Electron Microscopy, we found a profuse loss of alveolar epithelial cells in the lung. Confocal Microscopy was able to detect the presence of the SARS-CoV-2 nucleocapsid co-localized with key molecules such as Fibronectin, Vimentin, and PPARy, together with NLRP3 Inflammasome in the brain cortical tissues. **Conclusions.** The isolation of the SARS-CoV-2 virus was performed for the first time in Cuba in nasopharyngeal exudates of patients with COVID-19 in the Vero E6 cell line. We identified for the first time novel cellular and pathophysiological processes involved in the infection of SARS-CoV-2, as well as potential therapeutic targets that reveal promising drugs to combat COVID-19 and its sequelae.

Keywords: microscopy; SARS-CoV-2; physio pathogenesis; targets; tropism

INTRODUCCION

En el 2019, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades comenzaron a monitorear el brote de un nuevo coronavirus, SARS-CoV-2 (del inglés *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2*), que causa la enfermedad respiratoria que conocemos actualmente como COVID-19.

La detección del SARS-CoV-2 en diferentes órganos y diversas manifestaciones del COVID-19, como complicaciones del sistema nervioso central y cardiovascular, lesión renal y

síntomas del tracto gastrointestinal, sugieren que los sitios de infección extrapulmonares contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. ⁽¹⁾ El análisis *post mortem* y el posible impacto del SARS-CoV-2 en diferentes órganos es valioso para comprender la propagación del virus y los mecanismos fisiopatológicos de la infección. Especialmente, la identificación del tropismo celular viral puede ser crítico para la patogénesis inducida por virus, siendo relevante para conocer los mecanismos de infección del SARS-CoV-2 e identificar nuevas dianas terapéuticas.

Este trabajo se basa en la caracterización por microscopía electrónica y confocal del virus SARS-CoV-2; desde su aislamiento en exudado nasofaríngeo reportándose el primer caso en Cuba del virus SARS-CoV-2; diagnóstico y caracterización viral en varios tejidos de pacientes con COVID-19 y su relación con la fisiopatogénesis, amplio tropismo, dianas moleculares y terapéuticas en autopsias de fallecidos por COVID-19.

Esta investigación consta de 2 bloques experimentales y objetivos:

- Aislamiento y caracterización
 - Análisis por microscopía electrónica (ME) del aislamiento del SARS-CoV-2 de pacientes cubanos con COVID-19, en células Vero E6.
 - Análisis por microscopía confocal (MC) del virus SARS-CoV-2 del epitelio nasal de pacientes cubanos con COVID-19, a través de la técnica de inmunofluorescencia.
- Patogénesis, tropismo, dianas moleculares y terapéuticas
 - Pulmón
 - Riñón
 - Hígado
 - Cerebro
- Potenciales dianas terapéuticas
- Fármacos prometedores para combatir el SARS-CoV-2

MÉTODOS

Las muestras analizadas en ambos bloques experimentales fueron de pacientes (bloque 1) y fallecidos (bloque 2) diagnosticados positivos al COVID-19, según su análisis de PCR en tiempo real (reverso-transcripción-reacción en cadena de la polimerasa), en el Hospital General Militar Dr. Luis Díaz Soto, La Habana.

- a) Se obtuvieron 4 muestras de la cavidad nasofaríngea y los hisopos (muestras clínicas) se colocaron en medio esencial mínimo (MEM) y suero bovino fetal al 1 %. Las células Vero E6 se cultivaron en MEM y se inocularon con muestras clínicas a 37°C. El efecto citopático (ECP) se registró diariamente bajo un microscopio invertido. Los pocillos en los que se observó un ECP se fijaron en glutaraldehído al 3,2 %, tetróxido de osmio y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Las secciones ultrafinas de 50 nm se examinaron con un microscopio electrónico de barrido MIRA3-TESCAN, utilizando un detector de transmisión de electrones a las 72 h después de la infección.
- b) Se estudiaron 5 pacientes que fallecieron por COVID-19. Se obtuvieron muestras de órganos viscerales, incluidos los pulmones, el hígado y los riñones y cerebro dentro de las 3 h posteriores a la muerte. Para preparar criocortes, los tejidos se fijaron con paraformaldehído durante 2 h.

El SARS-CoV-2 y las características patológicas se evaluaron mediante la tinción de tricrómica de Masson (TTM),⁽²⁾ la microscopía electrónica (ME)⁽³⁾ y la microscopía confocal (MC).⁽⁴⁾ Las muestras se analizaron utilizando el microscopio de fluorescencia de barrido láser OLYMPUS FV1000 IX81 y el *software* de imágenes FlowView Viewer v3.1.

RESULTADOS

Análisis por microscopía electrónica, del aislamiento del SARS-CoV-2 de pacientes cubanos con COVID-19, en células Vero E6

Las células Vero E6 infectadas mostraron daño extenso o muerte celular. En las muestras clínicas se pudieron observar partículas de virus y viriones extracelulares, que variaban de 80 nm a 125 nm de diámetro (figura 1A). En particular, las partículas virales se mostraron en vesículas lisas intracelulares y viriones extracelulares en estrecho contacto con la membrana plasmática y las protuberancias de filopodio (figura 1B, 1D). Las células infectadas dañadas contenían abundantes partículas virales ubicadas cerca de las vesículas de doble membrana (figura 1C). Estas partículas pueden encontrarse en varias vesículas (figura 1C) que pueden detectarse en el medio extracelular.

Nuevas dianas celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de COVID-19 en tejidos post-mortem de pulmón, riñón e hígado y cerebro

Pulmón

Tanto las evidencias clínicas como patológicas indican el desarrollo del síndrome de dificultad respiratorio agudo (SDRA) en todos los pacientes estudiados. El tejido pulmonar mostró evidencias de un patrón distintivo de daño alveolar difuso (DAD) con fases avanzadas predominantes (fases fibroproliferativas y fibróticas). A través de las técnicas de inmunohistoquímicas por MC, la proteína de la nucleocápside (NC) del SARS-CoV-2 fue localizada en el epitelio alveolar ACE2+, en las células de tipo endotelial (CTE), en las células similares a macrófagos (CSM), en las células epiteliales bronquiales y en las alveolares (K10), en las células progenitoras endoteliales (CD34) (figura 2A) y en los monocitos/macrófagos (CD68).

Para agregar evidencia de la interacción del SARS-CoV-2 con componentes de la matriz extracelular (MEC) y en células similares a fibroblastos (CSF), analizamos la colocalización de la NC con las dianas moleculares claves involucradas en la respuesta de reparación tisular (RRT) y en la patogénesis pulmonar. La NC se codetectó con la fibronectina en los tabiques alveolares (figura 2B), revelando una tinción de tipo fibrilar y un patrón de partículas intracelulares en las células lipogéni-

cas similares a fibroblastos pulmonares (CLSF). En particular, se encontró la NC en las células Vimentina+ (VMT+), incluidas las células similares a fibroblastos (CSF) (figura 2C). A continuación, se investigó la presencia del SARS-CoV-2 en lipofibroblastos (LPF). Sorprendentemente, la NC pudo identificarse en las células intersticiales que mostraban la presencia simultánea de gotas de lípidos y PPAR γ activado, lo que sugiere la presencia del SARS-CoV-2 en los lipofibroblastos (LPF) que muestran la señalización de PPAR γ (figura 2D).

Nuevas dianas celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de COVID-19 en tejidos post-mortem de riñón

La NC también se localizó en las células intersticiales peritubulares con fibronectina y ACE2+. Es importante destacar que se observó la NC predominantemente en el aparato

yuxtaglomerular. Además, se pudo detectar la NC en los podocitos, en las células mesangiales y en las endoteliales de algunos glomérulos. Además, se detectó la NC en la región medular, en el endotelio de los vasos CD34+ y en las células intersticiales.

Nuevas dianas celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de COVID-19 en tejidos post-mortem de hígado

Por otra parte, la NC se observó en células sinusoidales endoteliales hepáticas (CSEH) en contacto con los hepatocitos infectados. Además, se detectó la NC en células CD34+. Curiosamente, la nucleocápside NC se colocalizó con la vimentina (VMT) en los hepatocitos que muestran un patrón de tinción granulado que indica una redistribución celular de la vimentina a sitios de replicación-morfogénesis viral.

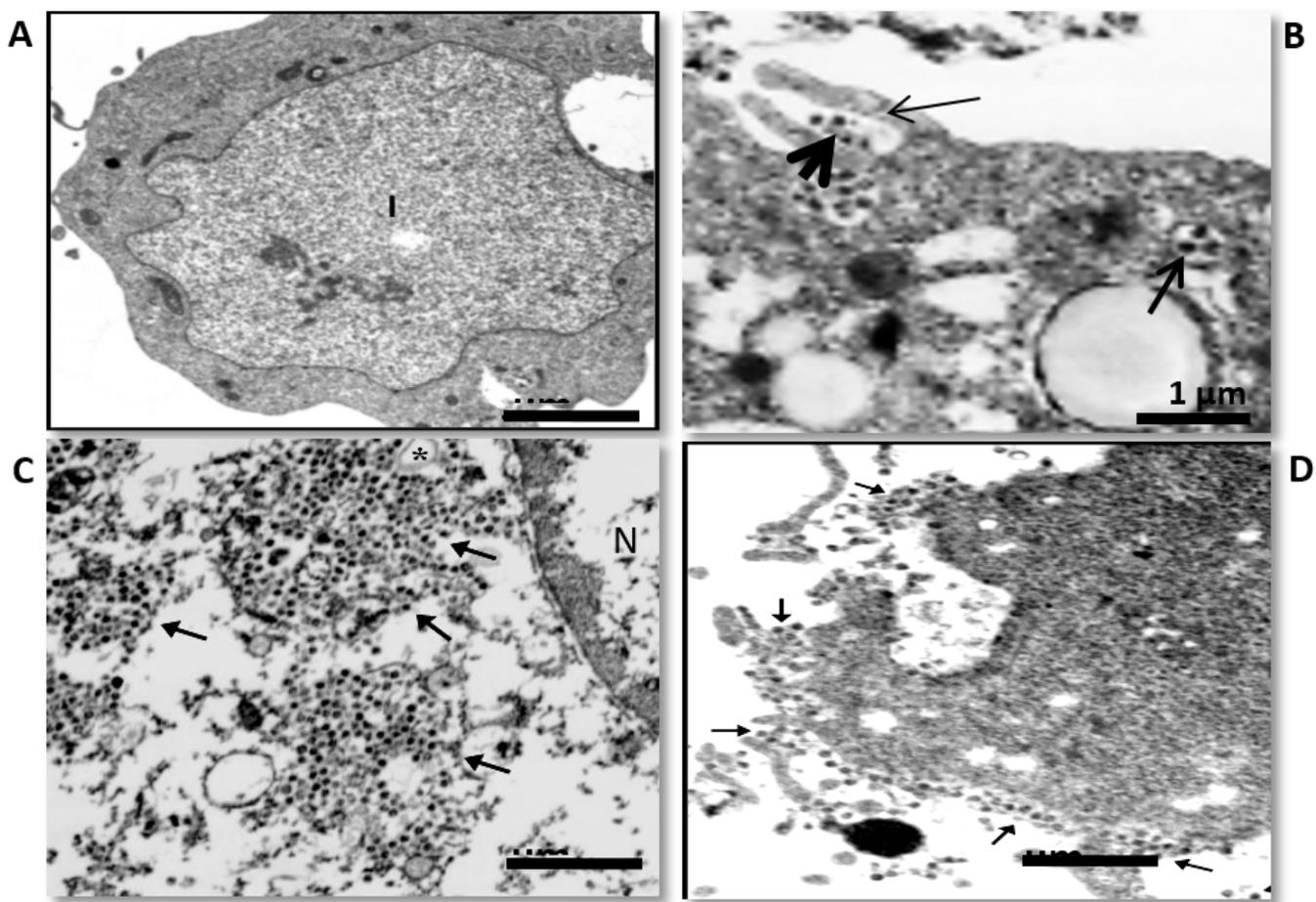


Fig. 1. Microscopía electrónica de células Vero E6 infectadas con SARS-CoV-2. Se muestran células Vero E6 no infectadas A) sin partículas virales, N: núcleo. Células Vero E6 infectadas con el aislamiento del SARS-CoV-2 C2018; B) C2016; C) y C2017; D) 72 h después de la infección. B) Parte de una célula Vero E6 dañada. Obsérvese las vesículas lisas que contienen partículas virales (flechas) y viriones liberados extracelular (puntas de flecha grandes) cerca de la superficie de los filopodios (F). Obsérvese las partículas virales dentro de una vesícula entre los restos de una célula dañada (pequeñas puntas de flecha). C) Parte de una célula Vero E6 dañada, con partículas virales (flechas) cerca de vesículas de doble membrana (*). N: núcleo; D) Parte de una célula Vero E6 con viriones extracelulares en contacto con la membrana celular (flechas). (Barras: 1 μ m).

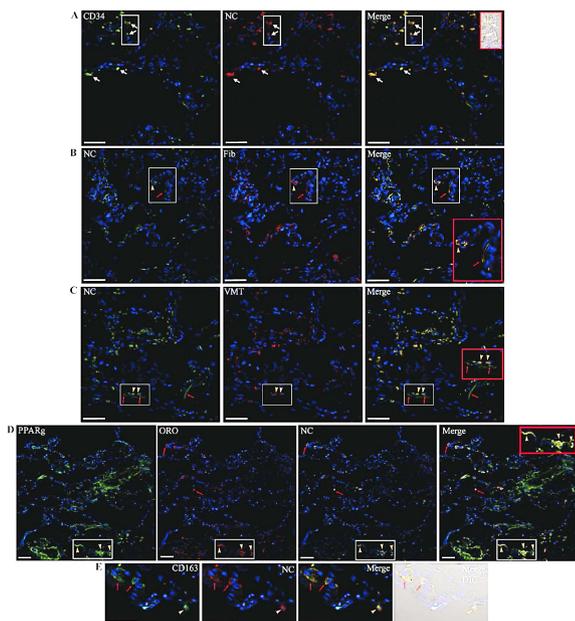


Fig. 2. Microscopía confocal de secciones de pulmón del paciente R incubadas con varias combinaciones de anticuerpos de conejo y ratón contra la nucleocápside (NC) y las proteínas del huésped, seguidas de Alexa 647-(A647) e IgG anti-ratón/coneja conjugadas con fluoresceína/FITC solas o en diferentes combinaciones, o teñido con Oil red (ORO, canal Tx Red); y DAPI para teñir el núcleo (canal azul). A) Nucleocápside (NC)-(A647) localizado en células de tipo endotelial CD34 + (FITC) (flechas). B) NC (FITC) y fibronectina (Fib) (A647) colocalizados (merge) en los tabiques alveolares con un patrón de partículas (punta de flecha) o una tinción similar a fibrilar (flecha) relacionada con las células productoras de Fibronectina (Fib9). C) Nucleocápside (NC) (FITC) co-localizado con vimentina (VMT) + (A647) (puntas de flecha). D) Se detectó NC (A647) en células que mostraban GL concomitantes (ORO) y PPAR γ activado (FITC) (puntas de flecha) y también en células que contenían gotitas de lípidos (GL) pero no PPAR γ activado (flechas). E) NC (A647) localizado en macrófagos alveolares (puntas de flecha) e intersticiales (flechas) CD163 + (FITC). Merge: colocalización. Barras: 50 μ m.

Nuevas dianas celulares y moleculares involucradas en la patogénesis de COVID-19 en tejidos *post-mortem* de cerebro

La proteína de la NC se colocalizó en una variedad de células típicas del sistema nervioso central (SNC), que fueron identificados usando anticuerpos contra NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos), CNPasa (oligodendrocitos) e Iba-1 (microglia). Posteriormente, se identificaron los mediadores potenciales de la patogenicidad de este virus en el SNC humano. En particular, también se observó coinmunotinción de la NC con un componente clave del eje neuroinflamatorio: el inflammasoma NLRP3 (figura 3).

En la figura 4 se muestra esquema integrador de los diferentes tipos celulares y dianas terapéuticas que participan en la patogénesis de la infección por SARS-CoV-2.

DISCUSIÓN

El análisis por microscopía electrónica de células Vero E6 con los aislamientos del SARS-CoV-2 ilustró la presencia de las partículas de virus y de viriones extracelulares similares a los descritos previamente para el SARS-CoV y para el SARS-CoV-2. ⁽⁵⁾ Los viriones extracelulares se observaron próximos a la membrana plasmática y alrededor de las protuberancias filopodiales. Esta característica parece ser importante para el ciclo de vida del SARS-CoV-2, lo que sugiere la participación de los filopodios en la transmisión del virus de célula a célula. ⁽⁶⁾ En este estudio, se confirmó por primera vez en Cuba en células Vero E6, el aislamiento del virus SARS-CoV-2 de exudados nasofaríngeos de pacientes con COVID-19, utilizando RT-PCR y ME. ⁽⁷⁾

La lesión pulmonar directa mediada por el SARS-CoV-2 se ha demostrado que es relevante en las primeras etapas de la infección, mientras que las etapas posteriores del desarrollo del DAD se han asociado principalmente con las respuestas del huésped. Mediante la TTM, se muestran evidencias experimentales de las 3 fases del DAD (Fases: exudativa, fibroproliferativa y fibrótica), estando interrelacionadas y superpuestas en el desarrollo del DAD. Sin embargo, se identificó un predominio de las etapas más avanzadas del DAD, respecto a la exudativa, en las muestras analizadas en este estudio.

La presencia de la NC en la interfaz del endotelio capilar y de las células epiteliales alveolares, así como en el tejido conectivo adyacente, implica directamente al SARS-CoV-2 en el daño sostenido y en la interferencia con la interfase alveolar aire-sangre, en la desregulación de la respuesta inmune que conducen a un aclaramiento viral deteriorado, una regeneración epitelial reducida y una remodelación tisular patológica.

Esto concuerda con otros estudios que describen la presencia de los componentes del SARS-CoV-2 en el endotelio capilar de los pulmones y un aumento de la expresión de ACE2 en el endotelio vascular. ⁽⁸⁾ Los nuevos hallazgos de este trabajo incluyeron la detección de los componentes del SARS-CoV-2, que sugieren una infección viral en una variedad de células incluidas: las células lipogénicas similares a fibroblastos (CLSF) pulmonares que muestran características de lipofibroblastos (LFP), como la señalización con PPAR γ activado, las gotas de lípidos (GL) que expresan fibronectina y vimentina, siendo estas moléculas posibles dianas de terapias antivirales.

Otro hallazgo interesante fue la presencia de la NC tanto en la fibronectina cortical peritubular y medular renal, como en las células intersticiales ACE2+. Por otro lado, las células intersticiales del lecho capilar peritubular de la corteza renal han participado en la detección del contenido del oxígeno ar-

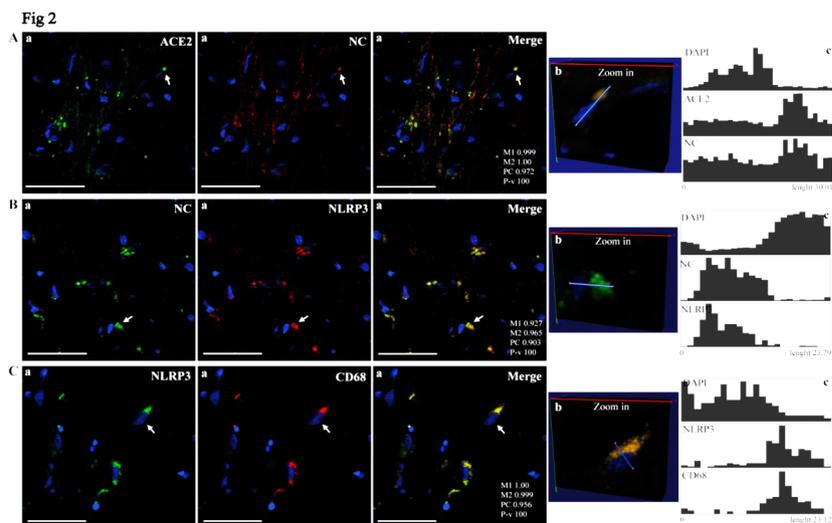


Fig. 3. Microscopía confocal de la nucleocápside (NC) del SARS-CoV-2 y los marcadores de la entrada del huésped viral y la neuroinflamación en la corteza cerebral de pacientes fallecidos con COVID-19. Los paneles muestran la colocalización de la nucleocápside viral (NC) con ACE2; A) y el inflammasoma (NLRP3); B) o la detección conjunta de CD68 con NLRP3; C). Las flechas apuntan a un roi que se muestra como una vista zoom-in en el espacio 3D; B) y el perfil cuantitativo asociado de la intensidad del vóxel de la imagen de los diferentes tintes a lo largo de un segmento de línea 3D; C) utilizando el software Vaa3D. Análisis de correlación de intensidad de roi. Barras: 50 μ m.

terial que está relacionado con la tensión del oxígeno alveolar y con el intercambio de los gases alveolares. Este proceso regula la producción de eritropoyetina (EPO) y eritropoyesis por las células intersticiales renales. Este hallazgo plantea la posibilidad de que el SARS-CoV-2 pueda afectar directamente y desregular funciones críticas de estas células, como la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que está involucrado en la regulación de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos.⁽⁹⁾

Las características ultraestructurales relacionadas con el virus que se observaron en los hepatocitos fueron consistentes con las observadas en las muestras de pulmón y riñón que respaldan la infección hepática por SARS-CoV-2 y su posible participación en la patogénesis mediada por virus. Las mitocondrias dañadas fue un hallazgo común y parece ser un objetivo importante para la reprogramación metabólica mediada por los virus y la patogénesis in vivo.⁽¹⁰⁾ Por lo tanto, la presencia de SARS-CoV-2 en las células CD34 del hígado, puede estar relacionada con la patogénesis viral o con condiciones preexistentes del huésped como la esteatosis hepática.

El presente estudio ilustra que la NC se colocaliza con proteínas neuronales y gliales específicas en la corteza cerebral, lo que sugiere la posibilidad de que el tropismo celular diverso del SNC del SARS-CoV-2 podría ser altamente deletéreo como se propuso por Pan R y col.⁽¹¹⁾ Por otro lado, en una serie de 41 casos post mortem, se encontró activación microglial, lo que confirma el importante papel de este tipo de células del SNC en lesiones cerebrales por SARS-CoV-2.⁽¹²⁾ Nuestro estudio

revela que la infección del cerebro por SARS-CoV-2 ocurre en múltiples tipos de células del SNC e induce la activación del inflammasoma NLRP3 en la microglia, que puede estar involucrado en diversas complicaciones neurológicas relacionadas con COVID-19. Por lo tanto, nuestros datos apuntan a estrategias terapéuticas centradas en la inhibición del inflammasoma microglial NLRP3 para prevenir las secuelas neurológicas, así como para promover la recuperación neurológica de los pacientes con COVID-19.

La evidencia experimental acumulada apoya fuertemente la aplicación segura del compuesto tetrapirrólico natural Ficocianobilina (FCB) para el daño inducido por COVID-19 al sistema nervioso central.⁽¹³⁾ La FCB tiene potencial para contrarrestar los efectos posteriores de la activación del inflammasoma que están mediados por IL-1 β , ya que se ha informado que la activación endosómica de NOX2 desempeña un papel catalítico en la señalización de IL-1 β .

Por su parte, el CIGB 210 es un péptido de 18 aa derivado de la región 1A de queratina-10⁽¹⁴⁾ y se ha asociado su efecto a la vimentina. Actualmente se asocia a la vimentina como posible diana para el tratamiento de COVID-19.⁽¹⁵⁾ Dado que la vimentina tiene un papel en la enfermedad, el uso de fármacos dirigidos a la vimentina puede ofrecer una ventaja sinérgica para el tratamiento del SARS-CoV-2.

Conclusiones

Se realizó por primera vez el aislamiento del virus SARS-CoV-2 en Cuba en exudados nasofaríngeos de pacientes con

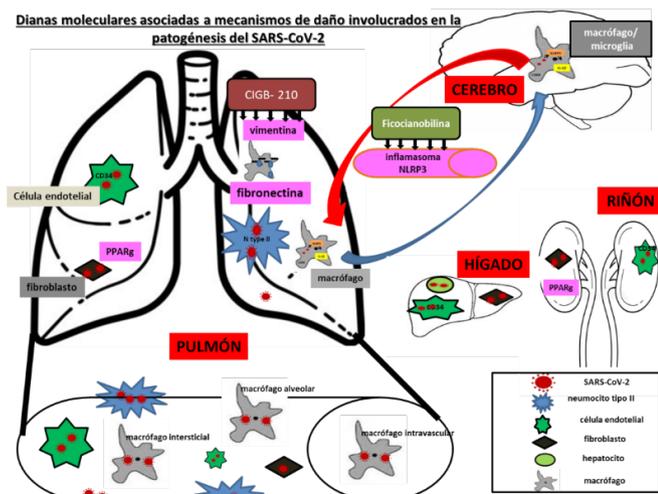


Fig. 4. Esquema integrador de los diferentes tipos celulares y dianas terapéuticas que participan en la patogénesis de la infección por SARS-CoV-2.

COVID-19, en la línea celular Vero E6, utilizando la microscopía electrónica para confirmar también su efecto citopático. Se identificaron por primera vez novedosos procesos celulares y fisiopatológicos involucrados en la infección del virus SARS-CoV-2 en pulmón, riñón, hígado y cerebro. Se detectó la presencia de la proteína de la NC viral colocalizada con las moléculas claves tales como: la fibronectina, la vimentina, el PPAR γ , lo que sugiere a estas moléculas como potenciales dianas antivirales. Se detectó la presencia de la proteína de la NC viral conjuntamente con el inflammasoma NLRP3 en cerebro, lo que sugiere el papel crítico de este tipo de inflammasoma, constituyendo una diana terapéutica para fármacos anti-SARS-CoV-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradley BT, Maioli H, Johnston R, Chaudhry I, Fink SL, Xu H, *et al.* Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];396(10247):320-32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32682491/>
- Foronjy RF, Dabo AJ, Taggart CC, Weldon S, Geraghty P. Respiratory syncytial virus infections enhance cigarette smoke induced COPD in mice. *PLoS One* [Internet]. 2014 [consultado 29 nov 2021];9(2). Disponible en: <https://pmc/articles/PMC3938768/>
- Falcón V, Acosta-Rivero N, Chinaea G, Gavilondo J, De la Rosa MC, Menéndez I, *et al.* Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jun 13;305(4):1085-90.
- Zhou X, Loomis-King H, Gurczynski SJ, Wilke CA, Konopka KE, Ptaschinski C *et al.* Bone marrow transplantation alters lung antigen-presenting cells to promote TH17 response and the development of pneumonitis and fibrosis following gammaherpesvirus infection. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2016 [consultado 29 nov 2021];9(3):610-20. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/mi201585>

- Helmy YA, Fawzy M, Elswad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J Clin Med* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];9(4):1225. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344679/>
- Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, White KM, Rezelj VV, Correa Marrero M *et al.* The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];182(3):685-712.e19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32645325/>
- Romero EN, María Enriquez Puertas J, Yans L, Zaldivar M, González Sosa NL, De T, *et al.* SARS-CoV-2 Isolation from Cuban COVID-19 Patients. *Am J Rare Disord Diagnosis Ther* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];009-15. Disponible en: www.scireslit.com
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):271-80.e8.
- Furuhashi M, Moniwa N, Takizawa H, Ura N, Shimamoto K. Potential differential effects of renin-angiotensin system inhibitors on SARS-CoV-2 infection and lung injury in COVID-19. *Hypertension Research.* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];43:837-40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32433641/>
- Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhler S, *et al.* Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];28(6):853-66.e5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33245857/>
- Pan R, Zhang Q, Anthony SM, Zhou Y, Zou X, Cassell M, *et al.* Oligodendrocytes that survive acute coronavirus infection induce prolonged inflammatory responses in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];117(27):15902-10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32571951/>
- Thakur KT, Miller EH, Glendinning MD, Al-Dalahmah O, Banu MA, Boehme AK, *et al.* COVID-19 neuropathology at Columbia University Irving Medical Center/New York Presbyterian Hospital. *Brain* [Internet]. 2021 Oct 22 [consultado 29 nov 2021];144(9):2696-708. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33856027/>
- Pentón-Rol G, Marín-Prida J, McCarty MF. C-Phycocyanin-derived Phycocyanobilin as a Potential Nutraceutical Approach for Major Neurodegenerative Disorders and COVID-19-induced Damage to the Nervous System. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2021 [consultado 29 nov 2021];19. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/33829974>
- Dong M, Zhang J, Ma X, Tan J, Chen L, Liu S, *et al.* ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];131:110678. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220308714>
- Li Z, Paulin D, Lacolley P, Coletti D, Agbulut O. Vimentin as a target for the treatment of COVID-19. *BMJ Open Respir Res* [Internet]. 2020 [consultado 29 nov 2021];7(1):623. Disponible en: <https://smart.servier.com/>

Recibido: 14/06/2022

Aprobado: 15/09/2022

Agradecimientos

Los autores agradecemos a las siguientes personas y sus respectivas instituciones por su contribución y apoyo en este trabajo. Jorge Berlanga Acosta, Eduardo Pentón Arias, Javier Marín, Nathalie Gilva Rodríguez, José Suárez Alba, Lilianne López Nocedo, Glay Chinea Santiago, María del Carmen Domínguez, Israel Borrajero, Mónica Bequet Romero, Anna Caridys Ramírez, Dionne Casillas Casanova, Otto Cruz Sui, Enrique Rosendo Pérez Cruz, Yeosvany Cabrera Artilles, Nibaldo Luis González Sosa, Julio C Hernández-Perera, Anabel Alfonso-Falcón, Alina P Marín-Díaz, Maritza González Bravo, Ananayla Vizcaino Acosta, Daisy Sánchez Garzón, Tanibet Alba O'Reilly, Sheyla Bermudez Pérez, Amanda Isabel Borrego Díaz, Juan Enrique Valdés Carreras, José Ángel Silva, Ana V Casadesús, Briandy Fernández-Marrero, Rydell Álvarez, Tays Hernández, Gretchen Bergado, Miguel A González, Majel Cervantes Llanos, Beatriz Piniella Matamoros, Gilda Lemos Pérez, Karem Cobas Acosta, Hanlet Camacho Rodríguez, Anabel Álvarez Acosta, Juliet María Enriquez Puertas, Leticia del Rosario Cruz, Jorge Valdés Hernández, Luis Javier González1, Yanet Támara Hernández, Angela Estela Sosa Espinoza, María de Jesús Leal Angulo, Marta Ayala Ávila, Eulogio Pimentel Vázquez, Martha Pupo Peña, Lamay Dorta Espinosa, Luis Ariel Espinosa Rodríguez, Isela María García Tamayo, Blanca Rosa Gonzales Mendoza, Yeny Mercedes Cascaret Nápoles, Silian Cruz León, Caridad González Molina, Olga Pérez Torres, María de los Ángeles Fernández Rodríguez, Maydee Nuñez Yaugel y Yamilka Rodríguez

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Viviana Falcón Cama, Giselle Penton Rol, Nelson Acosta Rivero, Teresita de Jesús Montero González
Curación de datos: Viviana Falcón Cama, Giselle Penton Rol, Nelson Acosta Rivero, Teresita de Jesús Montero González
Análisis formal: Viviana Falcón Cama, Giselle Penton Rol, Nelson Acosta Rivero, Teresita de Jesús Montero González
Adquisición de fondos: Viviana Falcón Cama, Giselle Penton Rol, Nelson Acosta Rivero, Teresita de Jesús Montero González, Gerardo Guillén Nieto

Investigación: Viviana Falcón Cama, Giselle Penton Rol, Nelson Acosta Rivero, Gerardo Guillén Nieto, Celia Fernández Ortega
Metodología: Viviana Falcón Cama, Giselle Penton Rol, Nelson Acosta Rivero, Teresita de Jesús Montero González, Gerardo Guillén Nieto, Enrique Noa Romero, Brian Mondeja Rodríguez
Administración del proyecto: Viviana Falcón Cama, Nelson Acosta Rivero

Recursos: Viviana Falcón Cama, Daina Cremata García, Mariuska Matos Terrero

Software: Viviana Falcón Cama, Leonardo Oramas Díaz

Supervisión: Viviana Falcón Cama, Angelina Díaz García, Yorexis González Alfaro

Validación: Brian Mondeja Rodríguez, Omar Reinaldo Blanco Aguila, Anamary Suárez Batista, Enrique Noa Romero, Rodolfo Valdés Veliz, Angelina Díaz García, Yorexis González Alfaro

Visualización: Viviana Falcón Cama, Emilio Felino Acosta Medina, Daina Cremata García, Mariuska Matos Terrero

Redacción-borrador original: Giselle Penton Rol, Viviana Falcón Cama

Redacción-revisión y edición: Viviana Falcón Cama, Viviana Falcón Cama

Financiamiento

Los autores están financiados por sus respectivas instituciones.

Cómo citar este artículo

Falcón Cama V, Pentón Rol G, Montero González TJ, Acosta Rivero N *et al.* Potencialidades de la microscopía en la investigación del SARSCoV-2: aislamiento, fisiopatogénesis y dianas terapéuticas. An Acad Cienc Cuba [internet] 2023 [citado en día, mes y año];13(3):e1260. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1260>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

