

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 86. NÚMERO 1 (2020) · ENERO - MARZO
ACCESO ABIERTO





ANALES

RANF

REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA

REVISTA CIENTÍFICA

AÑO 2020 - VOLUMEN 86 - NÚMERO (01)

DOI: 10.32440/ANRAF.2020.89.04

DEPÓSITO LEGAL: M. 3.869-1958

I.S.S.N. 1697-428X

VOLUMEN 86. NÚMERO 1 (2020) · ENERO - MARZO

SUMARIO

ANÁLISIS

ALBERTO GOMIS BLANCO; VÍCTOR GARCÍA GIL. LA DIGNIDAD DE UN ENTOMÓLOGO. JUAN GIL COLLADO (1901-1986). MADRID: EDICIONES DOCE CALLES, 2018. 336 P. [ILUSTRADO].
ANTONIO I. GONZÁLEZ BUENO

COMENTARIO

APORTACIONES DE LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS EN EL ESTADO DE ALARMA MOTIVADO POR LA PANDEMIA DEL VIRUS SARS-COV-2
CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

DIVERSIDAD BACTERIANA EN AGUAS MINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO "URAUCO". PICHINCHA. ECUADOR.
FÉLIX ANDUEZA LEAL ET. AL.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

MVA-B COMO CANDIDATO VACUNAL FRENTE AL VIH/SIDA: DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LOS ENSAYOS CLÍNICOS PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO
CARMEN ELENA GÓMEZ RODRÍGUEZ

RECEPTOR MINERALOCORTICOIDE EXTRARRENAL. UNA POSIBLE NUEVA DIANA PARA COMBATIR EL DAÑO VASCULAR
ANA M. BRIONES Y RAQUEL RODRIGUES-DÍEZ

PAPEL DEL FARMACÉUTICO EN LA VENTA Y DISTRIBUCIÓN DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS
RAQUEL HIDALGO SANZ





**REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA**

Protección de datos: Anales RANF declara cumplir lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Depósito Legal: M. 3.869-1958

I.S.S.N. 1697-428X

Publicación trimestral
(4 números al año)

© 2020. Anales RANF

Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, ni transmitido por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, ni registrado por ningún sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

Anales RANF, a los efectos previstos en el artículo 32.1 párrafo segundo del vigente TRLPI, se opone de forma expresa al uso parcial o total de las páginas de Anales RANF con el propósito de elaborar resúmenes de prensa con fines comerciales.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

Disponible en internet:
www.analesranf.com
Atención al lector:
anales@ranf.com
Anales RANF.

*Calle de la Farmacia, 9-11
(Madrid)*

Revista editada por:

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Calle de la Farmacia, 9-11 (Madrid)
Teléfonos: 91 531 03 07 / 91 531 65 51
I.S.S.N 1697-428X



Presidente Comité Editorial

*Doadrio Villarejo, Antonio L.
Presidente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Directora Ejecutiva

*Salaices Sánchez, Mercedes.
Vicesecretaria de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Editor Científico

*Menéndez Ramos, José Carlos
Académico de Número de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Consejo Editorial

*Avendaño López, Carmen
Ribas Ozonas, Bartolomé
Villar del Fresno, Ángel María
Sellés Flores, Eugenio
Lacadena Calero, Juan Ramón Francés
Causapé, M^a Del Carmen Pascual-
Leone Pascual, Ana María
Rodríguez-Boto, Gregorio
Salinas Sánchez, Jesús
Académicos de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Coordinación RANF

Manuel Tirado Juárez

Coordinación ARP

Luis Javier Aróstegui Plaza

Diseño web

Montse López Ferres

Diseño revista

M. Nieves Gallardo Collado



Comité Científico

*Lacadena Calero, Juan Ramón
Tamargo Menéndez, Juan
Salaices Sánchez, Mercedes
Mayor Zaragoza, Federico
Rodríguez Artalejo, Antonio
Puerto Sarmiento, Javier
García Sacristán, Albino
Vilas Sánchez, Vicente
Rivas Martínez, Salvador
Nombela Cano, César
Menéndez Ramos, José Carlos
Sellés Flores, Eugenio
del Castillo García, Benito
Sentandreu Ramón, Rafael
Sánchez Muniz, Francisco José
Abelló Gallo, Juan
Ribas Ozonas, Bartolomé
Ortega Ortiz de Apodaca, Fidel
Basante Pol, Rosa
Alonso Fernández, María José
Ortiz Melón, José Miguel
Giménez Gallego, Guillermo
Medina Jiménez, José M^a
Cerdán García-Esteller, Sebastián
Barcina Angulo, Yolanda
Domínguez-Gil Hurlé, Alfonso
Esteban Rodríguez, Mariano
Monge Vega, Antonio
Cabezas Fernández del Campo, J. Antonio
Sanz Pérez, Bernabé
Guinovart Cirera, Joan J.
Vallet Regí, María
Francés Causapé, M^a del Carmen
Martínez Fernández, Antonio Ramón
Villar del Fresno, Ángel María
Avendaño López, M^a del Carmen
Miras Portugal, M^a Teresa
Manzanares Robles, Jorge
Doadrio Villarejo, Antonio Luis*

Comité Científico Internacional

*Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)
Prof. Lucette Bardet (Francia)
Kazuhiro Imai (Japón)
Fernando Quevedo Ganoza (Perú)
Vicenzo Tortorella (Italia)
Geoffrey Burnstock (Gran Bretaña)
Bernard Portha (Francia)
Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)
Herbert Zimmermann (Alemania)
Adolfo Pérez Miravete (Méjico)
Carl - Göran Eden (Suecia)*

ÍNDICE

ANÁLISIS

p. 07

ALBERTO GOMIS BLANCO; VÍCTOR GARCÍA GIL. LA DIGNIDAD DE UN ENTOMÓLOGO. JUAN GIL COLLADO (1901-1986). MADRID: EDICIONES DOCE CALLES, 2018. 336 P. [ILUSTRADO].

ANTONIO I. GONZÁLEZ BUENO

COMENTARIO

p. 09

APORTACIONES DE LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS EN EL ESTADO DE ALARMA MOTIVADO POR LA PANDEMIA DEL VIRUS SARS COV-2

CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

p. 19

DIVERSIDAD BACTERIANA EN AGUAS MINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO "URAUCO". PICHINCHA. ECUADOR.

FÉLIX ANDUEZA LEAL; Et. AI.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

p. 29

MVA-B COMO CANDIDATO VACUNAL FRENTE AL VIH/SIDA: DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LOS ENSAYOS CLÍNICOS PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO

CARMEN ELENA GÓMEZ RODRÍGUEZ

p. 61

RECEPTOR MINERALOCORTICOIDE EXTRARRENAL. UNA POSIBLE NUEVA DIANA PARA COMBATIR EL DAÑO VASCULAR

ANA M. BRIONES Y RAQUEL RODRIGUES-DÍEZ

p. 75

PAPEL DEL FARMACÉUTICO EN LA VENTA Y DISTRIBUCIÓN DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

RAQUEL HIDALGO SANZ

ALBERTO GOMIS BLANCO; VÍCTOR GARCÍA GIL. LA DIGNIDAD DE UN ENTOMÓLOGO. JUAN GIL COLLADO (1901-1986). MADRID: EDICIONES DOCE CALLES, 2018. 336 P. (ILUSTRADO). ISBN: 978-84-9744-229-9.

ALBERTO GOMIS BLANCO; VÍCTOR GARCÍA GIL. THE DIGNITY OF AN ENTOMOLOGIST. JUAN GIL COLLADO (1901-1986). MADRID: EDICIONES DOCE CALLES, 2018. 336 P. (ILUSTRADO). ISBN: 978-84-9744-229-9.

Antonio González Bueno¹

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

* **Corresponding author:** agbueno@ucm.es

Sent: February 1, 2020 | Reviewed: March 1, 2020 | Accepted: March 15, 2020. | Language of Manuscript: Spanish

DOI: 10.15568/anranf.2020.89.or01

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 07- 08

ANÁLISIS

El encuentro entre un historiador de la ciencia y un archivo personal rara vez es una casualidad, suele responder a un ejemplo más de serendipia; en el caso que nos ocupa es evidente. La relación entre Víctor García Gil, nieto de Juan Gil Collado, y Alberto Gomis Blanco, catedrático de Historia de la Ciencia en la Universidad de Alcalá, ha tenido como consecuencia una muy documentada y excelentemente ilustrada biografía de Juan Gil Collado (Martos, Jaén, 1901 - Madrid, 1986); entomólogo, formado bajo la dirección de Cándido Bolívar en el Museo Nacional de Ciencias Naturales, experto en dípteros y paludismo, al que la Guerra Civil obligó a un duro exilio interior.

Su peripecia vital, su historia personal, es, como los propios autores señalan en el título de esta obra, un canto a la dignidad. Un investigador que, ante la sensación de desamparo en la que le sumió la Guerra, supo reinventarse, transformar su inicial formación investigadora en la que se había formado para adquirir nuevas habilidades con las que sobrevivir y poder cohabitar con una situación política y social que nunca aceptó.

La obra se divide en dos partes, claramente separadas por el final de la Guerra Civil: 'La formación de un científico' (1901-1939) y 'La fuerza de la dignidad' (1939-1986); se unen a estas tres interesantes apéndices donde se recoge una catalogación de su archivo documental y fotográfico, un listado con las novedades taxonómicas descritas y los taxones a él dedicados y una bibliografía de Juan Gil Collado donde, junto a los textos científicos, comunicaciones a congresos, consultas emitidas y reseñas de sus trabajos se recogen los textos, mecanografiados, que permanecen inéditos.

En la primera parte, la anterior a la Guerra, los autores pasan revista a su nacimiento, en Jaén, y su infancia, en Madrid; los estudios en el Instituto de Bachillerato 'San Isidro'; su ingreso en la Universidad Central, donde cursó la Licenciatura en Ciencias, con premio extraordinario; sus primeros años laborales en el Instituto-Escuela; su ingreso, en 1921, en la Real Sociedad Española de Historia Natural,

de la mano de Cándido Bolívar; sus primeras expediciones al norte de África, entre 1923 y 1930, como preparador y conservador de las colecciones entomológicas del Museo Nacional de Ciencias Naturales; sus trabajos para la Comisión Central Antipalúdica, donde se hizo presente su conocimiento de los Culicidos; su colaboración con la revista *Eos*, órgano científico de la sección de Entomología del Museo; su dedicación profesional tanto en la Escuela Nacional de Sanidad como en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central; la participación, como delegado español, en el V Congreso Internacional de Entomología (París, 1932); su expedición a Fernando Poo, en 1933, junto a Federico Bonet y su colaboración en la organización del VI congreso internacional de Entomología (Madrid, 1935). Y, en el ámbito más privado, su matrimonio con Carmen Fernández Pérez, en el diciembre de 1925; su participación en la constitución de la editorial *Zeus*, junto a Cándido Bolívar, Vicente Sos y José Royo Gómez, entre otros; sus veraneos familiares en La Granja de San Ildefonso, donde conoció el estallido de la Guerra Civil.

El paréntesis obligado de la Guerra fue largo y angustioso para Gil Collado —y para tantos otros españoles—: sufrió arresto domiciliario en La Granja de San Ildefonso, trasladado, como resultado de una primera depuración, a Cadalso de los Vidrios; su posterior estancia en Cáceres y un regreso a un Madrid, saqueado y desconocido, del que había salido apenas unos años atrás.

Expulsado de la Universidad, vetado su acceso al Museo Nacional de Ciencias Naturales y con una familia que atender, Juan Gil Collado decide, en 1940, regresar a Cáceres para reinventarse como asesor de la lucha antipalúdica a la par que como docente de Ciencias Naturales: academias, colegios privadas y aún las clases particulares se convirtieron en el modo de obtener unos parvos ingresos con los que sobrevivir. Su estancia cacereña acabó en 1943; regresó a Madrid y, desde el curso 1944/45, se integró en el equipo docente del Colegio Estudio, fundado por Jimena Menéndez Pidal, Carmen García del Dies-



tro y Ángeles Gasset, remedo de lo que fue el Instituto-Escuela y en donde —hasta donde pudieron mantenerse— se instauraron los valores educativos propugnados por la Institución Libre de Enseñanza. En este año de 1944/45 entró en contacto con la empresa *Insectidas Cóndor*, ubicada en Zorroza (Bilbao) y en la que desempeñó el cargo de ‘entomólogo jefe’ hasta su jubilación, en 1971; en ella colaboró a la comercialización de ‘666’ un insecticida ‘netamente nacional’. En estos años de la década de 1940, en los que su pertenencia a centros oficiales le está vedada, colabora con revistas agropecuarias, como *Ganadería*, *Agricultura* o las *Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura*, donde su experiencia entomológica fue especialmente valorada. En un nuevo giro de su vida profesional, inicia su formación como farmacéutico en las aulas de la Universidad Central; lo logró con éxito y, en 1948, tras suavizarse las exigencias del Régimen, ingresó en el Departamento de Parasitología animal dirigido por Felipe Gracia Dorado, establecido en la Facultad de Farmacia; en 1950 finalizó los estudios de Farmacia, inicia entonces una nueva carrera académica que le llevará desde el puesto de ayudante (1952-1957) al de adjunto a cátedra, primero de manera provisional, luego en posesión de la plaza. Desde noviembre de 1952 formó parte de la Academia Nacional de Farmacia y, entre 1957 y 1967, fue experto de la Organización Mundial de la Salud. Pese a su jubilación en 1971, tanto en *Insectidas Cóndor* como en la Universidad Central, Juan Gil Collado continuó investigando en la Facultad de Farmacia de Madrid hasta su fallecimiento, acaecido el 26 de agosto de 1986.

Media docena de nuevos taxones llevan su nombre; son el reconocimiento de sus compañeros y sus discípulos a una actividad investigadora que se perpetuó pese a la dura travesía del desierto que supuso su exilio interior: F. Silvestri, J. Wagner, A. Sánchez-Covisa, J.A. Rodríguez Rodríguez, J. Guillén Lera, A. Estrada Peña, J. Lucientes, C. Sánchez, J.M. Úbeda Ontiveros, M. B. Rodríguez Baza, D.C. Guevara Benítez y M. Rojas Álvarez, le dedicaron el fruto de sus estudios a ese ‘irónico, elegante y sereno’ investigador que nunca perdió su dignidad.

APORTACIONES DE LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS EN EL ESTADO DE ALARMA MOTIVADO POR LA PANDEMIA DEL VIRUS SARS-COV-2

CONTRIBUTIONS OF THE BIOMEDICAL SCIENCES IN THE STATE OF ALARM CAUSED BY THE SARS-COV-2 VIRUS PANDEMIC

Carmen Avendaño López¹

¹ Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

*corresponding author: avendano@ucm.es

Sent: February 10, 2020 | Reviewed: March 15, 2020 | Accepted: March 20, 2020. | Language of Manuscript: Spanish

DOI: 10.15568/anranf.2020.89.or01

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 09 - 17

ORIGINAL

RESUMEN

Este artículo resume la información científica sobre las características de los virus SARS-CoV-2, incluyendo el fundamento y las dificultades a las que se enfrenta la búsqueda de su correcto y rápido diagnóstico, su tratamiento, y una prevención eficaz.

ABSTRACT

This article summarizes the scientific information about the characteristics of SARS-CoV-2, including the basis and difficulties that is facing the search for its correct and fast diagnosis and efficient procedures for its treatment and prevention.

Palabras Clave:

SARS-CoV-2
diagnóstico
tratamiento
prevención

Keywords:

SARS-CoV-2
diagnosis
treatment
prevention



1. INTRODUCCIÓN

En los momentos actuales, en que medio mundo está paralizado experimentando una situación de catástrofe desconocida hasta ahora, no podríamos titular estas líneas como he venido haciendo esporádicamente en nuestra revista Anales RANF: "Comentarios a una noticia", sino "Comentarios a una avalancha de noticias". Los datos acerca de la evolución del virus SARS-CoV-2 desde el punto de vista humano, social y económico son terroríficos y obligan a buscar esperanza buceando en la información que nos proporcionan las ciencias biomédicas para comprender la situación de la mejor manera posible. Estos días he intentado satisfacer mi curiosidad de ese modo, y ahora me atrevo a compartir esta información con ustedes a través de esta breve reseña, una más de las que nos llegan a través de los medios que demuestra a mi entender el poder terapéutico de la escritura en los periodos de confinamiento.

En primer lugar debo advertirles que, para facilitar su reconocimiento en gran parte de la literatura científica, se utilizan aquí las siglas en inglés y que, para aligerar este texto, se ha prescindido de representaciones gráficas. Tampoco se van a mencionar teorías conspiratorias, ni participar en el debate sobre cuales son las mejores estrategias para combatir a SARS-CoV-2, o los comentarios críticos sobre la gestión de la epidemia en España y en el mundo. Solo intentamos comentar someramente lo que nos dice la comunidad científica que, al igual que ocurrió en el comienzo del último brote del virus Ébola, se ha volcado para intentar superar este nuevo desafío.

2. QUÉ SON Y CÓMO ACTÚAN LOS VIRUS SARS-COV-2

Como es sabido, los virus son partículas compuestas por proteínas, material genético y, según el tipo de virus, una membrana llamada envuelta o cápside. Los miembros de la familia de los coronavirus, a la que pertenece SARS-CoV-2, pueden tener además una membrana que envuelve a la cubierta y está rodeada de espículas a modo de corona que el virus utiliza para reconocer y penetrar en las células humanas o de animales hospedadores a través del dominio de unión a un receptor (RBD) de las proteínas S que las recubren. Este dominio es el mejor candidato a antígeno que puede utilizarse para inducir protección a través de una futura vacuna. La denominación de proteínas S proviene de la palabra spike, espícula en inglés. Estas proteínas poseen dos subunidades: S1 y S2; la primera está implicada en el reconocimiento del receptor celular y la segunda participa en la fusión entre las membranas celulares y virales (1).

Es muy importante recordar que las partículas víricas no son seres vivos, no comen ni se mueven por sí solas. Tampoco pueden multiplicarse, y se encuentran flotando en el aire o depositadas en superficies hasta su desintegración. Un virus se reproduce cuando logra infectar una célula viva, en la que penetra porque ésta posee receptores que reconocen determinadas proteínas de la envuelta del virus (de las

espículas si son coronavirus). Una vez dentro de la célula liberan su contenido, y aprovechan los recursos y la maquinaria de ésta para multiplicarse con mucha eficiencia. En esta fase aparecen los síntomas de la enfermedad, que en el caso de SARS-CoV-2 afectan al sistema respiratorio y pueden generar una neumonía más o menos grave, denominada COVID-19, que puede resultar mortal.

Antes del año 2003, los coronavirus solo se conocían como causantes del resfriado común en humanos. La primera epidemia mortal conocida causada por ellos fue el síndrome respiratorio agudo (SARS), que surgió en el sudeste de China a principios del año 2003. Este brote afectó a 29 países, pero ocho meses después de que comenzara a manifestarse estaba contenido con medidas tradicionales de salud pública, y actualmente se considera extinguido.

En 2012 se identificó en Arabia Saudí el coronavirus MERS-CoV, causante del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS), que causó 858 muertes, la mayoría en Arabia Saudí. SARS y MERS-CoV parecen haber tenido su origen lejano en los murciélagos, ya que en ellos se detectan coronavirus muy semejantes. En el caso de MERS-CoV se han identificado a los dromedarios como hospedadores intermediarios entre el murciélago y el hombre. Este virus no se transmite eficientemente de un individuo a otro a menos que el contacto sea muy estrecho y, pasado un tiempo, solo se han detectado algunos casos aislados. Este comportamiento ha hecho pensar a los especialistas que MERS-CoV no está totalmente adaptado para propagarse y, a día de hoy, no parece que represente una amenaza pandémica. Sin embargo, no debe olvidarse que los virus cuyo material genético es RNA tienen una gran capacidad para generar mutantes que se adaptan rápidamente a las diferentes presiones de selección. Por eso, se piensa que MERS-CoV ha logrado replicarse desde su hospedador inicial, muy probablemente el murciélago, en organismos diferentes como son los dromedarios y los seres humanos, pero podría necesitar algún tiempo para lograr perfeccionar su transmisión entre estos últimos (2).

El 31 de diciembre de 2019, China comunicó a la OMS el brote de una nueva cepa causante de una neumonía grave, a la que se denominó COVID-19. El coronavirus responsable de la misma era una variante hasta entonces desconocida de los virus SARS, a la que se denominó SARS-CoV-2. Los virus del SARS ingresaban en su célula hospedadora uniéndose al receptor de la enzima convertora de angiotensina 2 (ACE-2), implicada en la regulación de la presión sanguínea, y se replicaban en la profundidad de los pulmones, lo que posiblemente contribuyó a una gran tasa de mortalidad, pero también a una propagación menos probable porque el contagio se producía cuando una persona estaba muy enferma.

Por su parte, MERS-CoV ingresa en sus células hospedadoras uniéndose al receptor de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). La enzima DPP-4, también llamada grupo de diferenciación 26 (CD26), se expresa en la membrana de distintos tipos de células y se asocia con la regu-



lación de la respuesta inmune, la transducción de señales, y la apoptosis (3).

Finalmente, el coronavirus SARS-CoV-2 también entra en las células hospedadoras por los receptores ACE-2, pero se multiplica en la nariz y las vías respiratorias superiores, como la gripe, por lo que se puede transmitir más fácilmente a través de la tos y los estornudos en una fase inicial de la enfermedad, siendo más difícil identificar y aislar a los enfermos antes de que infecten a otros. Puede afirmarse que la menor tasa de mortalidad de los virus SARS-CoV-2 en comparación con la del SARS es un alivio desde el punto de vista médico, pero obstaculiza su prevención.

Los estudios epidemiológicos iniciales practicados en China en pacientes hospitalizados con COVID-19, indicaron que la hipertensión arterial y la diabetes podían estar asociadas a un mayor riesgo de mortalidad, motivando la hipótesis en que los efectos adversos de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEI) y los antagonistas o bloqueantes de los receptores de la angiotensina 2 (ARA-II) tienen relación con esta evolución, ya que estos fármacos y algunos antidiabéticos pueden inducir la sobreexpresión de receptores ACE-2 como efecto secundario indeseable. Si esto fuera así, bastaría con modificar los tratamientos de estas dos enfermedades utilizando fármacos que posean otros mecanismos de acción y no sobreexpresen este receptor. Sin embargo, la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (Semfyc) ha manifestado que, de momento, la evidencia científica de esta relación no está demostrada, ya que los estudios epidemiológicos deben acompañarse con estudios de causalidad.

Al poco tiempo de su descubrimiento, los científicos chinos habían secuenciado el genoma de SARS-CoV-2, que posee cerca de 30.000 nucleótidos, y habían analizado el patrón genético de las proteínas de sus espículas. Estos datos se pusieron a disposición de todo el mundo, pero al parecer, éste no fue consciente de la magnitud del problema que se le venía encima, ya que este virus, aunque parece ser menos letal que SARS, tiene una tasa de contagio mucho mayor, y su rápida expansión puede llegar a colapsar los sistemas sanitarios provocando una mayor mortalidad. Actualmente, más de 600 secuencias de estirpes del virus SARS-CoV-2, aisladas y secuencias en todo el mundo, están en bases de datos de público acceso.

Las proteínas de espiga de SARS y de SARS-CoV-2 podrían haber evolucionado en el murciélago para enlazarse eficazmente al receptor de ACE2 y ser patógenas, aunque también es posible que el salto del animal al hombre lo realizara una versión no patógena, y la evolución a patógena se hubiera realizado en células humanas. Como el material genético de SARS-CoV-2 que vierte el virus en el citoplasma de las células infectadas es RNA monocatenario, su estabilidad es menor que la de la más robusta doble hélice de un virus DNA y, en consecuencia, su capacidad de mutación es mayor. También es mayor la posibilidad de que la inmunidad adquirida de forma natural o por

el uso de vacunas frente a esta cepa no sea útil en la siguiente oleada vírica (4). Esta es una circunstancia importante, porque si se deja que se infecte una gran parte de la población para proteger a los individuos en un próximo brote, no puede asegurarse la duración de la inmunidad lograda. Esta advertencia, ha sido una de las bases del informe realizado por el Imperial College y la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres para que Gran Bretaña cambiara la estrategia que había iniciado y se implantaran las políticas de confinamiento a pesar de la enorme repercusión económica de éstas.

3. DIAGNÓSTICO

Las infecciones respiratorias agudas, como son las neumonías causadas por patógenos bacterianos o víricos, requieren un diagnóstico de urgencia rápido y fiable para evitar un tratamiento antibiótico inadecuado y una posible propagación de la infección. La identificación de los agentes infecciosos utilizando los métodos de cultivo convencionales son largos, y en ocasiones no concluyentes debido a que el cultivo de algunos virus puede tener dificultades o no puede realizarse. Por eso, en numerosas enfermedades infecciosas se han complementado o sustituido los métodos clásicos de detección, como los cultivos y los inmunoensayos, por métodos de detección molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Estos procedimientos han revolucionado el diagnóstico médico y, en la actualidad, son una parte esencial en un laboratorio de diagnóstico.

La técnica PCR, que permite copiar y multiplicar un trozo de DNA específicamente seleccionado, ha resultado vital en la investigación y tecnología del DNA. Fue descubierta en 1983 por el bioquímico estadounidense Kary Banks Mullis, que recibió por este motivo el Premio Nobel de Química de 1993 compartido con Michael Smith. La detección de enfermedades hereditarias o la determinación de la paternidad son algunas de sus aplicaciones más populares. En el caso de COVID-19, la carga vírica se determina amplificando los genes presentes en una muestra del paciente, lo que puede hacerse desde mediados de enero tras la publicación del código genético del parásito. Para SARS-CoV-2 se requiere previamente transformar su RNA en DNA (la transcripción inversa), generando la cadena complementaria. Después del aislamiento del DNA, se amplifican fragmentos del gen diana (amplicones) y se detectan con sondas fluorescentes. La señal de fluorescencia que detecta la unidad óptica del instrumento de PCR aumenta con la cantidad de amplicones formados en tiempo real. Este procedimiento exige disponer de personal formado y de un equipamiento de alto rendimiento para extraer el RNA vírico y analizar centenares de muestras simultáneamente.

Muchos laboratorios anuncian estos días buenos resultados en la detección y determinación de la carga viral de SARS-CoV-2 utilizando nuevas técnicas que minimizan los falsos negativos y se resuelven en un tiempo corto. Por ejemplo, el laboratorio Virvell (una



empresa de Biotecnología de Granada), informó en su página web que el kit "Sars-Cov-2 Realtime PCR" es específico para COVID-19 y otros coronavirus relacionados con el SARS, y arroja resultados rápidos y confiables en 90 minutos. Imegen, un laboratorio valenciano especializado en genética y genómica, ha adaptado uno de sus centros para poder realizar 500 pruebas diarias de este coronavirus. La empresa biotecnológica de PharmaMar, denominada "Genómica", anunció también que había completado con éxito las pruebas realizadas en muestras de pacientes con sus kits de diagnóstico del coronavirus SARS-CoV2, en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III. Estos kits, que según la empresa han sido validados por la CE (acreditando el cumplimiento de los requisitos esenciales descritos en la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro), están disponibles comercialmente y son muy sensibles y específicos, por lo que este coronavirus podría detectarse incluso antes de que el paciente muestre síntomas.

A nivel internacional hay igualmente una lucha contrarreloj para incorporar al mercado nuevos kits diagnóstico rápidos y fiables. Roche, por ejemplo, ha desarrollado equipos totalmente automatizados que pueden proporcionar resultados en unas tres horas y han sido aprobados con urgencia por la FDA para su comercialización en EEUU. Dejando aparte el precio de estas pruebas, se ha hecho evidente que las instalaciones médicas y los laboratorios de diagnóstico se saturan, incluso en los países desarrollados, cuando llegan oleadas agudas de una infección y, en esta circunstancias, los tests diagnósticos se limitan a determinados pacientes. Esta actuación se justifica argumentando que cuando no hay síntomas, pueden darse falsos negativos si no hay suficientes virus en la muestra (generalmente recogida de la garganta o de la nariz) para que se obtenga un resultado positivo en una PCR.

Otra cuestión que preocupa relacionada con los tests diagnósticos es la probabilidad de que algunos pacientes recuperados siguieran siendo portadores o reinfectarse. A finales de febrero, tras conocerse que algunos pacientes dados de alta en China estaban enfermando de nuevo tras salir del hospital, la prefectura de Osaka en Japón comunicó que una mujer había dado positivo después de cumplir con los criterios de alta. Las personas convalecientes ¿podrían no tener suficientes anticuerpos para desarrollar la inmunidad y se están infectando de nuevo? ¿El virus permanece dormido en el organismo antes de crear nuevos síntomas? Para algunos, estos primeros casos de "reinfección" se pueden atribuir a discrepancias en los tests diagnósticos o a los diferentes protocolos para dar de alta a los enfermos. Aunque la reinfección no es imposible, hay que confiar en que cuando un individuo ha desarrollado una respuesta inmune generando anticuerpos en la primera infección, la segunda infección sea menos grave.

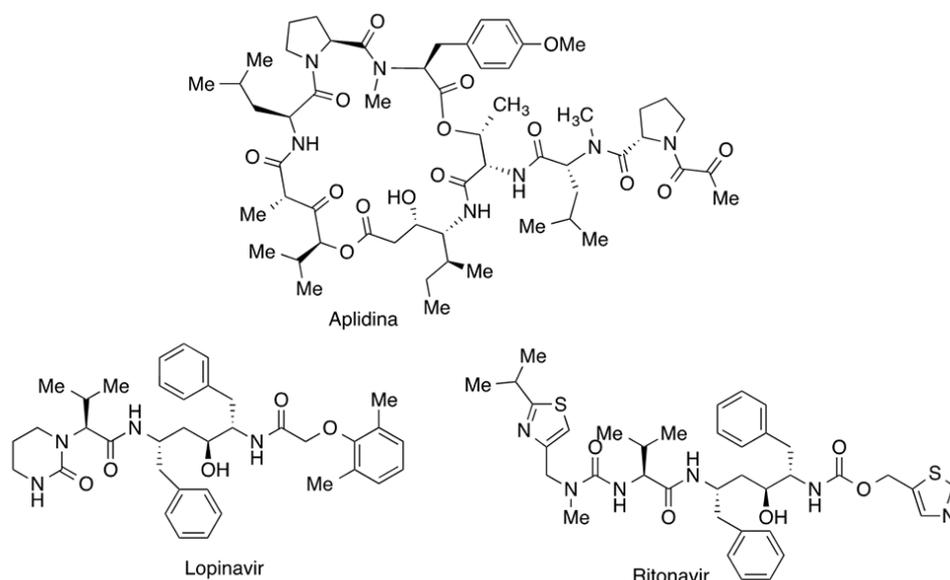
4. TRATAMIENTO

Aunque los más optimistas apuntan a plazos más cortos, se

acepta que pasarán unos 1,5 años antes de que se pueda desarrollar una vacuna apropiada, se comprueben sus efectos secundarios en todas las fases del ensayo, se apruebe por las autoridades sanitarias, se produzca en grandes cantidades, y se distribuya a todo el mundo. Por tanto, disponer lo antes posible de un tratamiento antiviral es particularmente importante. Un virus no es un ser vivo y, por tanto, no puede eliminarse con antibióticos. Solo se puede retrasar el contagio y reducir el tiempo de duración y la gravedad de la enfermedad que produce. Hasta ahora, no existen medicamentos contra el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 aunque, según la OMS, al menos 35 compañías están buscando un fármaco que pueda neutralizar los efectos de este virus. Para acelerar el proceso, se están ensayando diferentes fármacos o combinaciones de los mismos que han sido aprobados anteriormente para otros usos. En España se ha hablado mucho estos días de aplidina (o plitidepsina), un ciclodepsipéptido aislado de la ascidia *Aplidium albicans* comercializado como Aplidin® por PharmaMar. Éste se había declarado previamente orphan drug por la FDA y había sido aprobado en algunos países para el tratamiento del mieloma múltiple. La empresa ha comunicado que la aplidina logra detener la reproducción del coronavirus humano HCoV-229E. Hay que comentar que éste es uno de los virus responsables del resfriado común y por tanto se trata de otro virus y que, además, el ensayo inicial no ha pasado todavía de los estudios in vitro. Sin embargo, el virólogo Luis Enjuanes, que dirige junto a Isabel Sola y Sonia Zúñiga el laboratorio de coronavirus del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) en Madrid, ha comentado en una nota de prensa que se trata de "un resultado prometedor".

El esfuerzo para reposicionar a muchos fármacos análogos de nucleótidos o inhibidores de proteasa utilizados como antirretrovirales para HIV es ingente. Por ejemplo, la combinación de los inhibidores de proteasa lopinavir y ritonavir, comercializada por Abbvie con el nombre de Kaletra® para el tratamiento del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA en español), se ha estudiado en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla asociada con interferón ϵ . Desafortunadamente, los resultados preliminares de un estudio clínico realizado en China con lopinavir/ritonavir en adultos hospitalizados por infección con SARS-CoV-2 en estado grave, se han publicado en *New England Journal of Medicine* concluyéndose que este tratamiento no ofrece beneficios (5). No obstante, como falta aclarar si estos resultados se deben a que Kaletra® es ineficaz contra el nuevo coronavirus o a que los participantes en el ensayo ya habían desarrollado complicaciones demasiado graves para beneficiarse de este tratamiento, la OMS lo mantiene entre los tratamientos que se evaluarán los próximos meses en un ensayo clínico internacional.

En el Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, se ha iniciado otro ensayo para evitar la transmisión de esta epidemia con una combinación comercializada por la empresa Janssen denominada Rezolsta®, que se utiliza como tratamiento anti HIV. Esta combinación

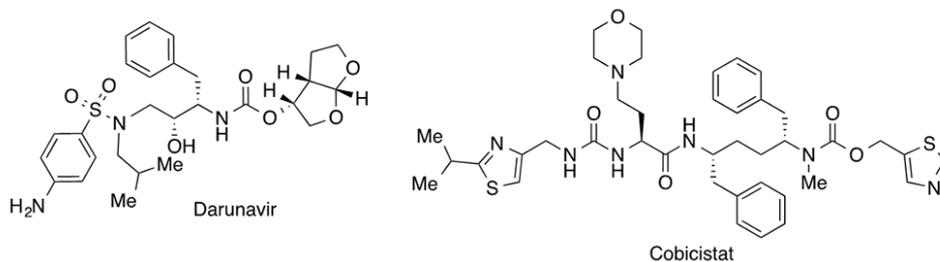


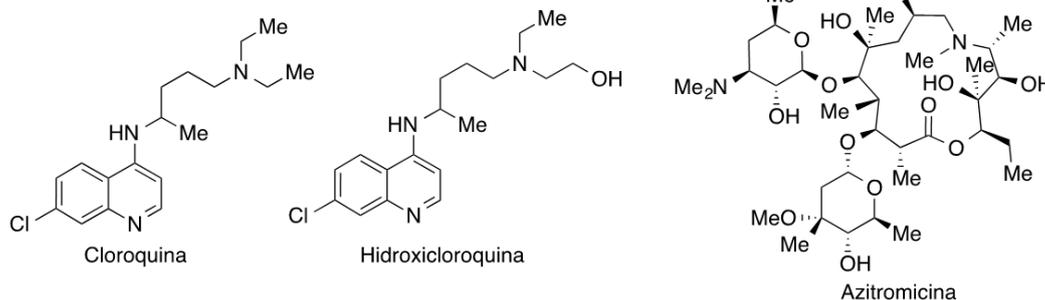
está formada por el inhibidor de proteasa darunavir y el inhibidor suida del citocromo P450 3A (CYP3A) cobicistat, que retrasa su degradación.

También se están estudiando combinaciones de antivirales (especialmente los activos frente a SARS y MERS) con el antimalárico cloroquina o su análogo menos tóxico hidroxiclороquina, el antibacteriano azitromicina (un antibiótico macrólido de amplio espectro que está incluido en los "protocolos sepsis" para prevenir una sobreinfección bacteriana), o el anticuerpo monoclonal sarilumab (Kevzara®). Estos estudios se basan en estudios *in vitro* y en un ensayo clínico con pacientes de COVID-19 en el Hospital Universitario de Marsella, que ha corroborado la eficacia de la cloroquina o la hidroxiclороquina para reducir la carga viral, lo que ha despertado mucho interés mediático a pesar del pequeño número de pacientes. A algunos de los enfermos de este ensayo francés se les administró también azitromicina, y esta asociación fue más efectiva que cuando se administró exclusivamente hidroxiclороquina (6).

La cloroquina y la hidroxiclороquina se han utilizado durante años en el tratamiento de la malaria, y también se emplean en ciertas amebiasis, en la artritis reumatoide, y en el lupus. La cloroquina, des-

cubierta en 1934, se encuentra en la Lista de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud, que incluye a los fármacos más seguros y efectivos que se requieren en un sistema sanitario. Desde el año 2005, se sabía que la cloroquina bloquea la reproducción de SARS-CoV-1 en cultivos celulares. Estos efectos antivirales se han relacionado con un aumento del pH que afecta sobre todo a las infecciones víricas que invaden las células a través de la vía del endosoma, como el virus de la gripe aviar o el virus del Zika entre otros. En este proceso, el material es englobado primero en una depresión endocítica, y los endosomas formados funcionan como transportadores. La disminución del pH cataliza la fusión de las membranas virales y celulares, permitiendo al virus verter su material genético y reproducirse; pero cuando las células se tratan con cloroquina o hidroxiclороquina, el pH del endosoma se eleva, lo que evita esta fusión y bloquea la infección viral. Un estudio realizado por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los EEUU encontró que la cloroquina inhibe la replicación del virus al reducir la glicosilación terminal de los receptores de ACE2 e interferir su unión con SARS-CoV-2, un hallazgo interesante. En EEUU se está ensayando la combinación de cloroquina o hidroxiclороquina con remdesivir (GS-5734). Este fármaco se diseñó original-





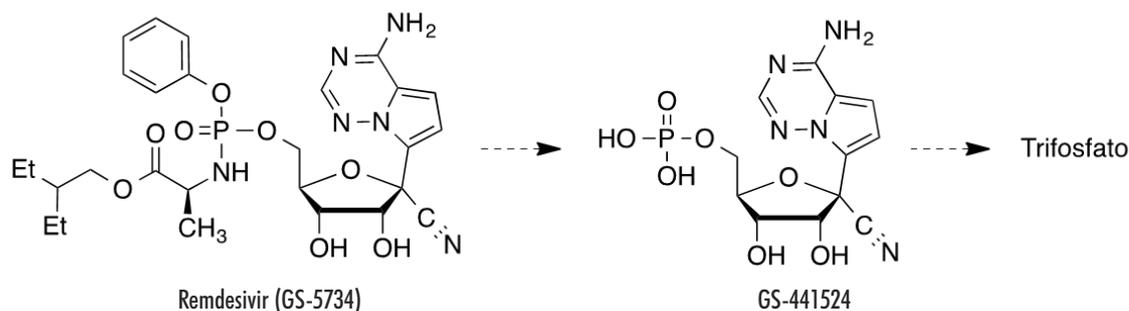
mente contra el virus Ebola por la empresa Gilead. Esta empresa desarrolló también sofosbuvir (Sovaldi®) contra el virus que origina la hepatitis C y la combinación denominada Truvada®, compuesta por emtricitabina y tenofovir disoproxilo, que es la primera que puede prevenir el contagio de HIV conocido como profilaxis preexposición. Dado que remdesivir había resultado eficaz contra el virus MERS y otros coronavirus, los médicos solicitaron la autorización de la FDA para usarlo con fines compasivos en COVID-19. Por ahora, parece que remdesivir salvó la vida de una mujer que se encontraba en estado grave en Sacramento, y se están llevando a cabo cinco ensayos clínicos con este fármaco: dos en China, uno en EEUU patrocinado por el Instituto Nacional de Salud (NIH), y otros dos que están en manos de Gilead y se realizan en distintos países. Al parecer, estos estudios están muy adelantados, aunque existen rumores acerca de las dificultades con que podría encontrarse la comercialización de este compuesto debido a algunos efectos secundarios observados.

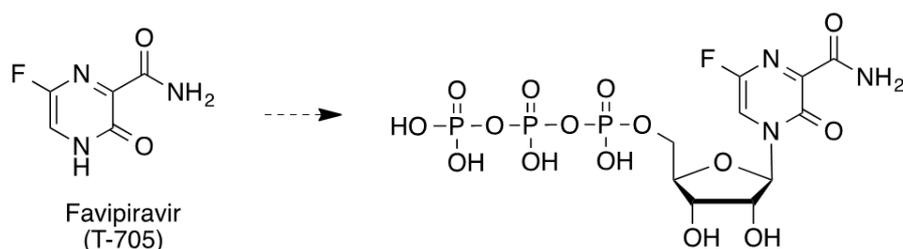
El mecanismo de acción de remdesivir se propuso en estudios previos con el virus MERS. Se trata de un profármaco con estructura de monofosforamido que se transforma en el C-adenosina nucleósido GS-441524, cuyo trifosfato es un análogo de ATP (trifosfato de adenosina) y otros nucleótidos, compitiendo con ellos como falso sustrato de la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRps). Esta enzima se inhibe tras la incorporación de este falso nucleótido a la cadena de RNA en crecimiento, de forma que cuando se incorpora a la posición $i + 3$ (7).

Favipiravir (T-705, Avigan®) es un profármaco antigripal

que parece tener buenas perspectivas. Su actividad antiviral se descubrió en el cribado de una biblioteca de compuestos en la compañía japonesa Fujifilm. Su ribosforilación intracelular da lugar a su forma activa, el correspondiente nucleótido en forma de trifosfato. Éste inhibe la polimerasa RNA dependiente de RNA (RdRp) y acelera la curación de COVID-19 si se administra pronto, aunque no parece funcionar tan bien cuando el virus ya se ha multiplicado. Desde el año 2014 está comercializado como antigripal en Japón, habiéndose ensayado clínicamente contra COVID-19 en Wuhan y Shenzen (China). Dos estudios realizados con un total de 340 pacientes, indican que favipiravir reduce el tiempo que necesitan estos enfermos para eliminar el virus de su organismo.

La empresa farmacéutica francesa Sanofi y el laboratorio estadounidense Regeneron han apostado por estudiar un anticuerpo monoclonal humano contra el receptor de la citocina interleucina-6 (IL-6). Este anticuerpo se denomina sarilumab (Kevzara®) que, análogamente al previamente conocido tocilizumab (Actemra®), se había desarrollado actividad antiinflamatoria para el tratamiento de la artritis reumatoide en combinación con metotrexato, habiendo recibido la aprobación de la FDA. En un estudio inicial realizado en China con 21 pacientes, se observaron evidencias de que IL-6 puede jugar un papel muy importante en la respuesta inmune inflamatoria que causa la dificultad respiratoria aguda en pacientes críticamente enfermos de COVID-19. Ambas compañías comenzarán a evaluar esta actividad en ensayos de fase 2/3 que se realizarán en Estados Unidos y en varios países de Europa, y Sanofi está investigando, además, posibles vacunas.





5. VACUNAS

La pugna por la primicia de una vacuna contra el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 es una carrera contrarreloj de ámbito mundial, ya que el primero en conseguirlo recibirá el reconocimiento mundial junto con una patente muy valiosa.

Es reconocido por todos que la vacunación podría ser el proceso más útil para prevenir y controlar enfermedades infecciosas. Aunque el desarrollo de las vacunas estuvo dirigido en un principio a la prevención de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos en personas y animales, a partir de 1980 empezó a dirigirse hacia otras enfermedades, incluido el cáncer (8). Las vacunas basadas en el uso de organismos muertos o de patógenos vivos con virulencia atenuada (LAV), han tenido y tienen un enorme éxito en el control y erradicación de infecciones humanas muy graves, como la viruela, polio, sarampión, paperas o rubeola. Aunque su virulencia está reducida, la respuesta inmune (en la que se producen anticuerpos neutralizantes y se activan linfocitos T para destruir las células infectadas) es muy grande, lo que es muy importante para atacar a patógenos intracelulares como los virus. Sin embargo, estas vacunas pueden producir enfermedades en personas inmunodeprimidas o revertir a formas virulentas debido a mutaciones o a su recombinación con otras formas biológicas transmisibles (9).

La vacunación por administración de DNA o RNA no liberados desde un virus, mimetiza a la infección e inmunización causadas por microorganismos vivos, siendo capaz de estimular a las células T cooperadoras foliculares (Tfh) y a la respuesta inmune mediada por los linfocitos B, que reconocen antígenos extraños al organismo a través de sus receptores de membrana (10).

La fabricación de estas vacunas es segura, rápida, y con menos riesgos de contaminación que los que conlleva el manejo de patógenos peligrosos. Sin embargo, si se utilizan moldes de ADN para expresar el antígeno, éstos deben primero atravesar las membranas citoplasmáticas y nucleares para transcribirse a mRNA, y volver después al citoplasma para iniciar la traducción. La complejidad de este proceso es responsable de la escasa potencia que mostraron estas vacunas en sus primeros ensayos clínicos (11). Aunque su eficacia ha aumentado con la aplicación de nuevas tecnologías para optimizar su farmacocinética, todavía persiste el riesgo de que el DNA exógeno se integre en el genoma del huésped y pueda inducir nuevas enfermedades. Por

todo lo anteriormente comentado, las vacunas mRNA tienen ventajas sobre las vacunas DNA.

Desde que se supo que el mRNA transcrito in vitro podía expresarse in vivo tras ser inyectado en músculos de ratones, empezó a pensarse en su utilización para la elaboración de vacunas, ensayándose por primera vez a principios de los años 1990 (12). En la última década, se han llevado a cabo ensayos en melanoma metastático, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, y otros tipos de cáncer (13), y aunque sigue habiendo problemas debidos a la inestabilidad que producen las ribonucleasas, su baja inmunogenicidad, y su producción a baja escala, estas vacunas son más ventajosas que las que utilizan vectores víricos o DNA. La síntesis de vacunas mRNA puede realizarse a través de una transcripción enzimática libre de células que tiene como componentes esenciales a los trifosfatos de nucleósidos, a plásmidos DNA que codifican al mRNA de la vacuna, y a una polimerasa RNA. Se puede aumentar la estabilidad y la eficacia de la traducción modificando el RMN, pero además, pueden utilizarse técnicas adicionales como la encapsulación en liposomas. La pureza del mRNA es esencial en el proceso de traducción, y la contaminación con RNAs derivados de la actividad de polimerasas de RNA aberrantes conduce a la inhibición de la traducción y a la degradación del mRNA, con la consiguiente disminución en la producción de proteínas (14).

El antígeno transcrito, se presenta al sistema inmune. En este proceso de reconocimiento de la vacuna por los sensores celulares, las vacunas mRNA no requieren un adyuvante inmunológico para reforzar la respuesta inmune porque RNA es el ligando de los receptores toll-like 7 y 8, que están implicados en la iniciación de la respuesta inmune innata y adaptada y reconocen una gran variedad de patrones moleculares. Estos receptores son glicoproteínas, cuyo dominio intracelular es responsable de la correspondiente vía de señalización descendente. Aunque los efectos de las vacunas mRNA en humanos no se han estudiado todavía en toda su extensión, los avances que se han logrado con ellas justifican el apoyo que obtienen de los fondos privados y de las instituciones para soportar los gastos de su investigación y desarrollo (15). Algunos expertos opinan que las primeras vacunas mRNA contra COVID-19 estarán pronto disponibles porque son fáciles de fabricar y darán cierta protección, aunque la duración de ésta es dudosa.

Comentaremos algunos ejemplos entre las muchas compañías y grupos de investigación dedicados actualmente a desarrollar



una vacuna eficaz contra esta pandemia. La compañía "ARN Arcturus Therapeutics", con sede en San Diego (California) investiga una vacuna para COVID-19 cuyo enfoque es el ARN autorreplicante.

La empresa BioNTech, situada en Maguncia (Renania-Palatinado, Alemania), Pfizer, y la compañía farmacéutica Fosun Pharma ubicada en Shanghái, desarrollarán conjuntamente en Europa, EEUU y China una potencial vacuna mRNA contra COVID-19 denominada BNT162. El inicio de los ensayos clínico a finales de abril se anunció el mismo día que comenzaba oficialmente en España el estado de alarma sanitaria tratando de ralentizar la expansión de este virus.

Otra compañía farmacéutica alemana con base en Turingia denominada "CureVac", trabaja en colaboración con el Instituto Paul Ehrlich para desarrollar una vacuna que, al parecer, tiene posibilidades, aunque la empresa descarta que esté disponible antes de un año. La compañía biotecnológica estadounidense "Moderna Therapeutics", con base en Massachusetts, ha desarrollado junto al NIH otra vacuna mRNA denominada mRNA-1273 que ya ha empezado a ensayarse en Seattle con 45 adultos voluntarios sanos. Ésta está diseñada para atacar una forma estabilizada de la proteína S.

Hacia mitad de marzo, varias instituciones chinas también anunciaron que pondrían en marcha en abril ensayos clínicos para comprobar la eficacia de varias vacunas que el país está desarrollando contra el coronavirus SARS-CoV-2. El Ministerio de Defensa, en concreto, comunicaba que el equipo de la epidemióloga Chen Wei, conocida por haber liderado un equipo para crear una vacuna contra el virus del Ébola, había desarrollado con éxito una vacuna que podía fabricarse a gran escala y estaba basada en vectores virales de la gripe. Al parecer disponía del permiso para iniciar los ensayos clínicos, aunque no se precisaba la fecha exacta de comienzo.

En España, dos equipos del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) trabajan en distintas estrategias para conseguir una vacuna contra esta pandemia. La vacuna que prepara el equipo del Dr. Enjuanes se basa en generar un virus completo SARS-CoV-2 al que se le han eliminado regiones de virulencia, por lo que se trata de un virus atenuado. Este equipo utilizó una táctica semejante para desarrollar una vacuna contra SARS en 2014, nada más terminar el brote de esta enfermedad. Sus características se perfeccionaron en 2016, pero que no llegó a comercializarse porque el virus surgido en 2002 desapareció y no ha vuelto a detectarse.

La aproximación que sigue el equipo del Dr. Mariano Esteban (Jefe del Grupo Poxvirus y Vacunas en el CNB) para conseguir una vacuna contra COVID-19, se basa en la inducción de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 por un vector atenuado del virus vaccinia, Modified Vaccinia Ankara (MVA), que expresa el gen completo que codifica la proteína S (spike) del coronavirus. Esta misma aproximación la ha seguido anteriormente en la producción de vacunas frente a otros virus emergentes como Chikungunya, Ébola y Zika, induciendo altos

porcentajes (80-100%) de protección en modelos animales. El Dr. Esteban, que investiga también en los últimos años una potencial vacuna contra el HIV que ya ha empezado a probarse con buenos resultados, espera obtener el virus recombinante con la secuencia completa en un mes, y luego demostrar que induce anticuerpos neutralizantes.

Por su parte, la empresa Takeda ha iniciado el estudio de un tratamiento con globulina hiperinmune (H-IG) extraída del plasma de pacientes que han superado la enfermedad o han sido vacunados. Esta inmunización pasiva se ha mostrado eficaz en otras infecciones respiratorias graves, y es una de las recomendadas por el virólogo español García Sastre, Director de Salud Global y Patógenos Emergentes del Hospital Monte Sinai en Nueva York.

Aún se ignoran datos fundamentales sobre el nuevo patógeno que son esenciales para estimar su progresión, pero ojalá que podamos oír en un futuro próximo de esta pandemia algo parecido al comentario que hizo en 2004 el Dr. Heymann, responsable de la unidad de enfermedades infecciosas de la OMS durante la pandemia del SARS: "La respuesta al SARS se benefició de la buena fortuna y la buena ciencia".

6. REFERENCIAS

1. Kirchdoerfer, R. N.; Cottrell, C. A.; Wang, N.; Pallesen, J.; Yassine, H. M.; et al. Prefusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 2016; 531, 118-121.
2. Yang, Y.; Liu, C.; Du, L.; Jiang, S.; Shi, Z.; et al. Two mutations were critical for bat-to-human transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2015; 89, 9119-9123.
3. Zhao, J.; Li, K.; Wohlford-Lenane, C.; Agnihothram, S. S.; Fett, C.; et al. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111, 4970-4975.
4. Tang, X.; Wu, C.; Li, X.; Song, Y.; Yao, X.; et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl. Sci. Rev.* 2020; DOI: 10.1093/nsr/nwaa036.
5. Cao, B.; Wang, Y.; Wen, D.; Liu, W.; Wang, J.; et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *New Eng. J. Med.* 2020; doi:10.1056/NEJMoa2001282.
6. Colson, P.; Rolain, J.-M.; Raoult D. Chloroquine for the 2019 novel coronavirus - ResearchGate. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020; 55, 105923.
7. (a) Agostini, M. L.; Andres, E. L.; Sims, A. C.; Graham, R. L.; Sheahan, T. P.; et al. Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *mBio* 2018; 9, e00221-18. (b) Gordon, C. J.; Tchesnokov, E. P.; Feng, J. Y.; Porter, D. P.; Götte, M. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Biological Chemistry* 2020; Manuscript AC120.013056.



8. Cuzick, J. Preventive therapy for cancer. *Lancet Oncol.* 2017; 18, e472-e482.
9. Zhou, B.; Meliopoulos, V. A.; Wang, W.; Lin, X.; Stucker, K. M.; et al. Reversion of cold-adapted live attenuated influenza vaccine into a pathogenic virus. *J. Virol.* 2016; 90, 8454-8463.
10. (a) Pardi, N.; Parkhouse, K.; Kirkpatrick, E.; McMahon, M.; Zost, S. J.; et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat. Commun.* 2018; 9, 3361. (b) Pardi, N.; Michael J.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA vaccines - A new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018; 17, 261-279.
11. Kutzler, M. A.; Weiner, D. B. DNA vaccines: Ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 2008; 9, 776-88.
12. Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247, 1465-1468.
13. Savelyeva, N.; Ottensmeier, Ch. (Editors). "Cancer Vaccines". *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer International Publishing AG 2017.
14. Weissman, D. mRNA transcript therapy. *Expert Rev. Vaccines* 2015; 14, 265-281.
15. Cuiling Zhang, C.; Giulietta Maruggi, G.; Shan, H.; Li, J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 2019, 10:594. doi: 10.3389/fimmu.2019.00594 .

7. DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA.

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en la presente revisión.

Si desea citar nuestro artículo:
Aportaciones de las ciencias biomédicas en el estado de
alarma motivado por la pandemia del virus SARS-CoV-2
Carmen Avendaño López
An Real Acad Farm (Internet).
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) : pp. 09 - 17

DIVERSIDAD BACTERIANA EN AGUAS MINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO “URAUCO”. PICHINCHA. ECUADOR.

BACTERIAL BIODIVERSITY IN MINEROMEDICINAL WATERS OF SPA “URAUCO”. PICHINCHA. ECUADOR

Félix Andueza Leal^{1,4}; Judith Araque^{1,4}; Yonathan Parra¹; Susana Arciniegas^{1,5}; Rolando Guaila²; Sandra Escobar²; Gerardo Medina^{3,4}

¹Universidad Central del Ecuador. Quito Ecuador. ; ²Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba. Ecuador. ; ³Universidad Estatal Amazónica. Puyo. Ecuador.; ⁴Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.

⁵Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. España.

*corresponding author: fdandueza@uce.edu.ec

Sent: February 1, 2020 | Reviewed: March 1, 2020 | Accepted: March 15, 2020. | Language of Manuscript: Spanish

DOI: 10.15568/anranf.2020.89.or01

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 19 - 28

ORIGINAL

RESUMEN

La presencia de manantiales de aguas mineromedicinales en Ecuador se encuentra en relación con el gran número de volcanes que existen en el país, los cuales se han venido utilizando desde épocas remotas como medicamentos por la población. Sin embargo, se desconoce cuál es la biodiversidad bacteriana presente. Por ello, el objetivo del trabajo fue determinar la biodiversidad bacteriana de las aguas mineromedicinales del balneario “Urauco” ubicado en la Provincia de Pichincha. Ecuador. Se tomaron muestras de agua de un volumen de 1 litro en dos puntos del balneario. Los muestreos se realizaron en 2 ocasiones durante un periodo de dos años. Para la toma y transporte de las muestras se siguieron las normas ecuatorianas INEN 2 176-98 y INEN 2 169-98. Para la determinación de la biodiversidad bacteriana se utilizó las técnicas de siembra, selección e identificación de bacterias indicadas por Barrow y Felton (2004) y MacFaddin (2004), complementadas con las pruebas bioquímicas contenidas en las galerías API (BioMérieux) y galería Microgen (Microgen corp.). Los resultados señalan una población de bacterias heterótrofas en las aguas del balneario de $3,1 \times 10^2$ UFC/mL, con la prevalencia de las bacterias Gram negativa de la clase Gamma Proteobacterias. Se pudo aislar e identificar 64 colonias de bacterias. Los géneros de bacterias encontrados fueron *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Budvicia*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Edwardsiella*, *Enterococcus*, *Ewingella*, *Flavobacterium*, *Kurthia*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Yakonella*. La biodiversidad bacteriana observada fue alta, aunque escasa en número de individuos.

ABSTRACT

*The presence of mineromedicinal water springs in Ecuador is related to the large number of volcanoes that exist in the country, which have been used since ancient times as medicines by the population. However, it is unknown what bacterial biodiversity is present. Therefore, the objective of these work was to determine the bacterial biodiversity of the mineromedicinal waters of “Urauco” spa located in Pichincha Provinces of Ecuador. Water samples of a volume of 1 liter were taken at two points in each spa studied. Sampling was done 2 times over a period of two year. To take and transport the samples, the Ecuadorian standards INEN 2 176-98 and INEN 2 169-98 were followed. For the determination of bacterial biodiversity, the techniques of planting, selection and identification of bacteria indicated by Barrow and Felton (2004) and MacFaddin (2004) were used, complemented with the biochemical tests contained in the API (BioMérieux) galleries and Microgen (Microgen corp.). The results indicate a population of heterotrophic bacteria in the spa waters of 3.1×10^2 CFU / mL, with the prevalence of Gram negative bacteria of the Gamma Proteobacteria class. It was possible to isolate and identify 64 colonies of bacteria. The genera of bacteria were *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Budvicia*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Edwardsiella*, *Enterococcus*, *Ewingella*, *Flavobacterium*, *Kurthia*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Vibrio* and *Yakonella*. The bacterial biodiversity observed was high, although low in number .*

Palabras Clave:

aguas mineromedicinales
bacteriología
balnearios
microbioma
aguas termales
Ecuador

Keywords:

Mineromedicinal waters
bacteriology
spa; microbiome
thermal waters
Ecuador.



1. INTRODUCCIÓN

La utilización del agua mineral natural como medicamento se viene haciendo en el mundo desde hace siglos. La primera publicación sobre este tipo de agua se debe a Savoranola, quien en 1498 publica la obra "De Balneis et Thermis", considerado el primer tratado sobre las aguas mineromedicinales. De igual forma aparecen los tratados de Brancaloneo (1498), Adria (1536) y Fallopio (1546). Posteriormente, en 1571, Andrea Badius recoge en su libro "De Termis" las características y efectos de las aguas mineromedicinales, considerada una de las más importantes obras sobre el tema (1,2,3)

La primera publicación en el idioma español que se conoce sobre las aguas mineromedicinales fue realizada por el catedrático de la Universidad de Alcalá de Henares, Limón Montero, en el año de 1697, quien define en ese escrito lo que en ese momento se llegó a denominar agua mineromedicinal (4).

Para Limón Montero, el agua mineromedicinal era aquella que recibe extrañas virtudes de los minerales que la conforman y es utilizada como medicamento (4). Esta definición se mantuvo hasta que la hidrología médica, como resultados de las investigaciones científicas realizadas, logró establecer los principios científicos que sustentaron las nuevas definiciones sobre las aguas mineromedicinales.

En España, el catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, Dr. Manuel Armijo define las aguas mineromedicinales como aquellas que brotan de una fuente y pueden ser utilizadas directamente en terapias dado a que son reconocidas por los entes nacionales de salud como verdaderos medicamentos (5).

Las aguas mineromedicinales son utilizadas en Asia y en Europa desde hace siglos con fines terapéuticos en establecimientos balnearios. En la actualidad, esta forma de tratamiento ha ganado muchos adeptos, constituyendo una floreciente industria en estos continentes.

En Europa, en países como Alemania, España, Francia y Portugal, existe una cultura del uso de las fuentes de agua mineromedicinales con fines curativos, para tratar múltiples enfermedades, incluyendo artritis reumatoide, fatiga muscular, gota, problemas dermatológicos, trastornos circulatorios, digestivos, respiratorios y otras afecciones de la salud, todo ello de acuerdo a la composición química de las mismas, lo que ha resultado en una pujante industria de salud, donde cada año acuden miles de personas para buscar alivio a sus diferentes dolencias (6,7).

Uno de los aspectos menos conocidos de las aguas mineromedicinales a nivel mundial, es lo atinente a las características de población microbiana que las habita y sus posibles acciones en el ambiente y la salud.

En España, gracias al trabajo que ha venido desarrollando la comisión de aguas mineromedicinales de la Real Academia Nacional de Farmacia por varias décadas, se tiene un excelente panorama de la composición química y microbiológica de los principales balnearios de aguas mineromedicinales españoles

Sin embargo, en el continente americano, específicamente en los países latinoamericanos, a pesar de que las culturas ancestrales, como la de los aztecas, incas y mayas (camino del Inca), utilizaban las aguas termales de manera cotidiana, hoy en día su utilización como medicamento es limitado, y cuando se utilizan se hace en la mayoría de los casos de una manera empírica sin ningún tipo de rigor médico ni farmacológico. En estos países la mayoría de los estudios se han hecho abordando los aspectos geológicos, físicos y químicos (8,9,10,11,12,13), desconociéndose en la mayoría cuál es la composición microbiológica y propiedades terapéuticas.

El estudio de la microbiología de cada manantial tiene un interés sanitario, ya que una contaminación microbiana puede representar un riesgo para la salud de los agüistas y además nos puede indicar el grado de protección de los manantiales, así como también sus propiedades terapéuticas.

Las aguas mineromedicinales se distinguen por su composición química específica, en donde prevalecen las concentraciones de iones como sulfatos, fosfatos, nitratos, carbonatos, bicarbonatos, entre otras sustancias químicas, seleccionando de esta manera la existencia de especies microbianas capaces de sobrevivir en condiciones extremas de concentración de sal, pH y en algunos casos de temperaturas, lo que las hace particularmente atractivas en el estudio de microorganismos extremófilos con posibles aplicaciones biotecnológicas de interés para las industrias farmacéutica, alimenticia, química e incluso con aplicaciones en la biorremediación de compuestos nocivos para el medio ambiente (14,15,16).

Es por ello que conocer la composición y características de la microbiota presente en las aguas mineromedicinales es importante, no solo por sus implicaciones ambientales y ecológicas en relación con el conocimiento de la composición y función de la biodiversidad microbiana presente, sino también porque tienen repercusiones en la salud de las personas desde dos puntos de vista, por un lado dentro de esta microbiota pueden estar presentes bacterias patógenas que causan enfermedades infecciosas en los usuarios o transmiten genes de resistencia a los antibióticos, y por el otro, también pueden contener bacterias beneficiosas para curar algunos tipos de enfermedades o que producen metabolitos con importantes propiedades biotecnológicas, medicinales o industriales (17,18).

En Ecuador, se puede indicar que existe una gran cantidad de conocimiento ancestral en el uso de aguas termales como una terapia alternativa para curar varios tipos de enfermedades. La presencia de aguas termales asociadas con la presencia de volcanes ha sido utilizada desde la antigüedad por personas de diferentes grupos étnicos que habitan en esta área, que acuden a ellos para aliviar diversas dolencias, y en los últimos años se han convertido en un turismo atractivo (11). Sin embargo, aún se desconoce cuál es la biodiversidad de la mi-

crobiota asociada con la mayoría de estos entornos y su papel y las posibles propiedades ambientales, biológicas y ecológicas.

Los primeros estudios que se han realizado en Ecuador sobre la microbiología de las aguas mineromedicinales han sido llevados a cabo gracias al trabajo de cooperación universitaria entre el grupo de investigación de microbiología del agua de la Universidad de los Andes en Venezuela y los grupos de investigación en microbiología y biotecnología ambiental de la carrera de Ingeniería Ambiental de la Universidad Central del Ecuador (UCE) y el grupo de investigación en microbiología de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH), todo ello gracias al apoyo financiero de la Dirección de investigación y postgrado de la UCE y del Instituto de Investigación de la ESPOCH.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Sitio de muestreos

La presente investigación se llevó a cabo en las aguas mineromedicinales del Balneario Urauco en la Parroquia Lloa, perteneciente a la Ciudad de Quito, Provincia de Pichincha a una altitud de 2773 msnm en las faldas del volcán Guagua Pichincha, a 30 minutos de la parroquia Lloa, la misma que pertenece a la ciudad de Quito, Provincia de Pichincha, Ecuador (Ver figura 1).

Esta fuente de agua mineromedicinal es de origen volcánico, de tipo sulfatada, magnésica e hipertermal (9,10).

El balneario de aguas mineromedicinales de Urauco tiene

dos depósitos, el uno forma un manantial natural (Ver figura 2) y el otro una piscina termal con el punto de surgencia del agua termal en el centro de la piscina (Ver figura 3), en cada uno de ellos se estableció un punto de muestreo.

2.1.2. Muestras

Para la toma y transporte de las muestras se siguieron las normas ecuatorianas INEN 2 169-98 y INEN 2 176-98 (19,20).

Las muestras de agua mineromedicinal se recolectaron en dos épocas diferentes del año durante un periodo de dos años.

En cada ocasión, se tomaron 2 muestras de agua de 1 litro, recogidas en recipientes estériles de plástico, los cuales se trasladaron a temperatura ambiente y en la oscuridad al laboratorio, realizándose los análisis microbiológicos antes de las 24 horas.

2.1.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se prepararon a partir de las formas deshidratadas suministradas por las casas comerciales o mezclando los constituyentes del medio, de acuerdo con la fórmula correspondiente. Se reconstituyeron con agua destilada y posteriormente se esterilizaron en autoclave 120 °C durante 20 minutos a 15 PSI de presión.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Cuantificación, siembra y aislamiento de bacterias heterótrofas viables

La cuantificación, siembra y aislamiento de bacterias heterótrofas viables se realizó tanto por la técnica de filtración por membrana de 0,22 μm (21). Se utilizó el medio agar R2A (22) y el

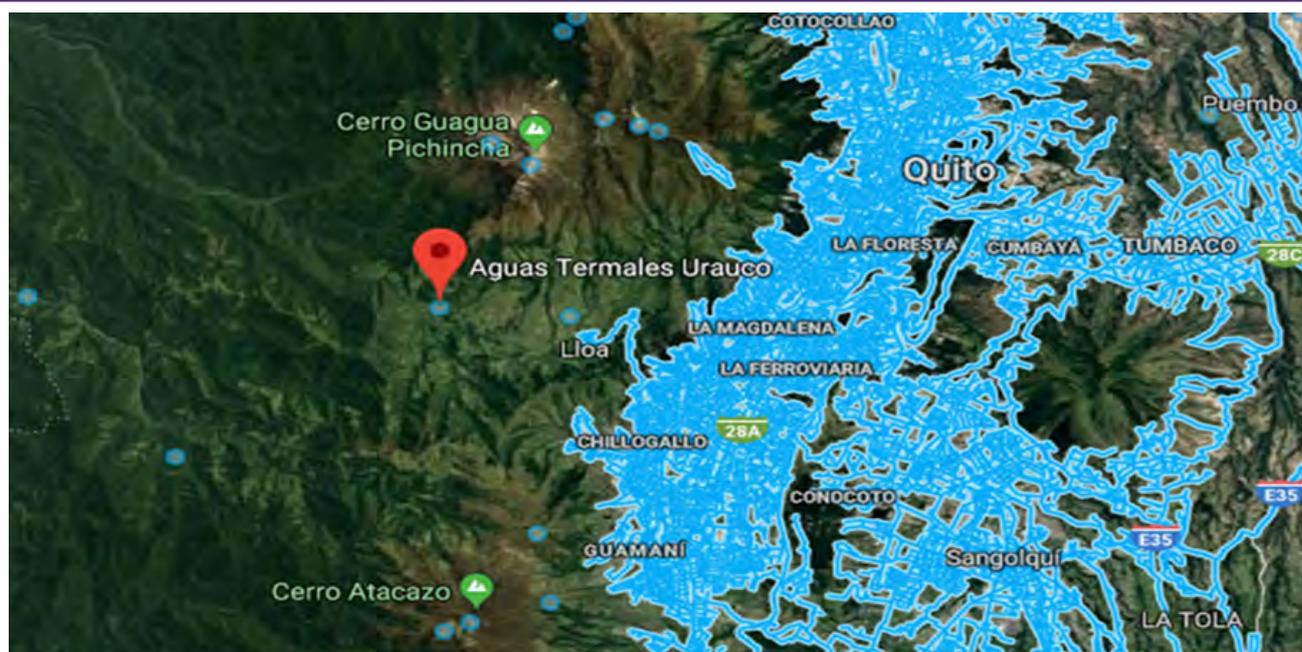


Figura 1. Mapa de la ubicación geográfica del balneario Urauco en la Parroquia Lloa, perteneciente a la Ciudad de Quito, Provincia de Pichincha, Ecuador (Google Maps)



Figura 2. Vista del manantial natural del Balneario Urauco en la Parroquia Lloa, perteneciente a la Ciudad de Quito, Provincia de Pichincha.



Figura 3. Vista del sitio de surgencia del agua termal en la piscina termal del Balneario Urauco en la Parroquia Lloa, perteneciente a la Ciudad de Quito, Provincia de Pichincha.

medio agar extracto de levadura (23), incubando en ambos casos a 37°C durante cuatro días. El volumen de muestra de agua filtrada fue de 100 mL. Los resultados se expresaron como medias aritméticas de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL). Las colonias más representativas y con morfología diferente se aislaron en agar soya tripticasa (AST) para su posterior identificación (1).

2.2.2. Identificación de bacterias heterótrofas viables

Las colonias aisladas de bacterias se identificaron por características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las pruebas se realizaron según lo indicado por Barrow y Feltham (2004) y MacFaddin (2004), complementadas con las pruebas bioquímicas contenidas en los kit de identificación bacteriana de las galerías API (BioMérieux) y Microgen (Microgen corp.) (24,25).

Entre las pruebas realizadas estuvieron:

Tinción de Gram, morfología de la colonia y producción de pigmento, producción de oxidasa, producción de la catalasa, oxidación-fermentación de la glucosa, observación de la movilidad, crecimiento en medio Kligler, producción de indol, producción de acetil-metil carbinol (Voges-Proskauer), prueba del rojo de metilo, utilización del citrato, producción de ureasa, desaminación de la fenilalanina, reducción de nitratos, producción de gas de la lactosa, hidrólisis de la esulina, crecimiento en agar MacConkey, producción de pigmentos, crecimiento a 42°C ,

observación de la morfología y posición de la espora, hidrólisis del almidón, hidrólisis de la gelatina y crecimiento en agar sangre (24,25).

2.2.3. Criterios de clasificación

Las cepas bacterianas aisladas se han clasificado siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (26,27,28) y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB) y publicadas en el *International Journal of Systematic Bacteriology*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han analizado diferentes muestras de aguas termales desde el punto de vista microbiológico mediante métodos estandarizados, utilizando cultivo, cuantificación, aislamiento e identificación taxonómica de bacterias. Los resultados obtenidos en la cuantificación e identificación de las bacterias y hongos presentes en las aguas estudiadas se resumen en las tablas 1 y tabla 2.

3.1. CUANTIFICACIÓN, SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS VIABLES

Se encontró que la cantidad de bacterias aerobias mesófilas promedio en el manantial natural fue de 4.60×10^2 UFC/mL, mientras que en el punto de surgencia dentro de la piscina termal estas bacterias se encontraron en menor cantidad con un valor promedio de 1.60×10^2 UFC/mL, al promediar los datos anteriores se registró que el total promedio de bacterias aerobias heterótrofas en el balneario Urauco fue de 3.1×10^2 UFC/mL, tal como se detalla en la tabla 1.

Los ambientes de las aguas mineromedicinales presentan microorganismos adaptados a las condiciones adversas de temperatura. Así, los dos puntos analizados en el balneario Urauco presentan una considerable cantidad de bacterias heterótrofas, pero con diferencias significativas en cada punto analizado. Al observar la tabla 1 la diferencia de bacterias aerobias mesófilas entre el manantial natural del agua termal (4.6×10^2 UFC/mL) y el punto de emergencia dentro de la piscina (1.6×10^2 UFC/mL) es de $3,0 \times 10^2$ UFC/mL. Esta diferencia se pudo deber a la ubicación y características de cada punto de recolección de las muestras, en el caso del manantial, el agua estaba acumulada y tenía contacto directo con el suelo, vegetación y fauna del lugar, a diferencia de la piscina donde la muestra se recolectó del punto de surgencia que se encuentra dentro de la piscina y está protegido.

Los resultados obtenidos en el conteo de bacterias heterótrofas en las aguas mineromedicinales del balneario "Urauco" son inferiores a los indicados para aguas mineromedicinales de otro balneario ecuatoriano, como lo es el balneario "Santagua de Chachimbiro", ubicado en la Provincia de Imbabura, en donde se señala una población de bacterias heterótrofas promedio de $1,00 \times 10^3$ UFC/mL (29), así como a los obtenidos para las aguas del balneario Cununyacu ubicado en la provincia de Pichincha, donde se obtuvo valores de bacterias heterótrofas de $1,875 \times 10^3$ UFC/mL (30).



Las diferencias antes señaladas son indicativas de que cada agua mineromedicinal es única, ello debido a que las características fisicoquímicas de cada manantial condicionan la sobrevivencia y proliferación de población bacteriana autóctona que se ha adaptado a través del tiempo, a las condiciones reinantes en este ecosistema (31).

Según el boletín oficial de Canarias N° 38, de 1989 orden que regula el régimen técnico sanitario de piscinas, se establece que la cantidad de bacterias aerobias heterótrofas totales debe ser menor a 200 UFC/mL, en cuyo caso el balneario Urauco estaría fuera del límite permitido. La diferencia es que el balneario Urauco no solo está formado por una piscina sino también por un manantial natural y ninguna normativa se ha establecido en Ecuador para este tipo de agua (32).

bacterias crecidas en el medio de cultivo utilizado, se realizó la identificación de cada una de las colonias bacterianas, los resultados se resumen en la tabla 2.

Al analizar la tabla 2, se puede señalar que la mayoría de las cepas bacterianas identificadas fueron bacterias Gram negativas (62,5 %) pertenecientes a la clase gamma proteobacterias, estando representadas las bacterias Gram positivas en menor porcentaje (37,5 %) y con la prevalencia entre ellas de la clase firmicutes.

En relación con las bacterias Gram negativas, se pudo identificar un total de 40 cepas que resultaron pertenecer a 17 especies, prevaleciendo las especies *Aeromonas caviae* (9 cepas) y *Pseudomonas fluorescens* (5 cepas) (Ver tabla 2)

En el caso de las bacterias Gram positivas se logró aislar un total de 24 cepas pertenecientes a 9 especies, donde prevalecieron las especies *Bacillus spp* (5 cepas) y *Staphylococcus saprofiticu* (4 cepas)

Parámetro	Manantial natural				Punto de surgencia de la piscina			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
Bacterias heterótrofas (UFC/mL)	4,1x10 ² ±6,02	5,2x10 ² ±9,5	2,0x10 ² ±13,5	7,1x10 ² ±1,53	1,3x10 ² ±1,0	2,0x10 ² ±2,5	1,6x10 ² ±5,5	1,3x10 ² ±1,0
Contaje promedio por punto de muestreo (UFC/mL)	4,6x10 ² ±7,63				1,6x10 ² ±2,5			
Contaje promedio en					3,1x10 ² ±5,1			

Muestras: M1; M2. M3. M4

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias /mililitros

Tabla 1. Resultados promedios del contaje de bacterias heterótrofas viables presentes en el agua mineromedicinal del balneario "Urauco. Provincia de Pichincha. Ecuador.

Por otra parte, si comparamos los valores obtenidos en la cuantificación de las bacterias heterótrofas, con los obtenidos en otros países, como es el caso de España, donde se han estudiado una gran cantidad y variedad de balnearios mineromedicinales, podemos observar que, en la mayoría de los casos, los valores indicados en este trabajo son mayores a los encontrados en las aguas mineromedicinales españolas (33,34,35,36). Ello pone de relieve el hecho de que, en España, los acuíferos y las condiciones sanitarias de estas aguas, reciben un control fisicoquímico y microbiológico más estricto, además de contar con normativas para su control (31).

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS HETERÓTROFAS VIABLES

Luego de la cuantificación y aislamiento de las colonias de

(Ver tabla 2).

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas en las aguas termales del balneario de Urauco son similares a los obtenidos para la mayoría de los manantiales de aguas termales del Ecuador, donde se ha observado un claro predominio en estos ecosistemas de las bacterias Gram negativas (36,37,38,39).

Jacho (2015) en una investigación realizada en las aguas termales del Balneario Rumiloma de la Parroquia Guangopolo Provincia de Pichincha de Ecuador, indica la prevalencia en esas aguas de bacilos Gram negativos con un 73 % de aislamiento (40), resultado similar al observado en el presente estudio.

En un estudio realizado por Flores (2011), en aguas mineromedicinales del balneario Santa Apolonia, ubicado en Mérida Ve-



Tabla 2. Clase, géneros y especies de bacterias identificadas en las aguas mineromedicinales del balneario "Urauco". Provincia de Pichincha. Ecuador

Tipo de bacteria	Clase de bacteria	Especie bacteriana	Numero de cepas	Porcentaje de aislamiento (%)
Bacterias Gram negativas	4	17	40	62,5
	Gamma proteobacteria	<i>Aeromonas caviae</i>	9	14,06
	Gamma proteobacteria	<i>Aeromonas salmonicidas sup. salmonicida</i>	3	4,69
	Beta proteobacteria	<i>Acidovorax delafieldii</i>	1	1,56
	Alfa proteobacteria	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2	3,13
	Gamma proteobacteria	<i>Budvicia aquatica</i>	1	1,56
	Gamma proteobacteria	<i>Citrobacter freundii</i>	3	4,69
	Gamma proteobacteria	<i>Edwardsiella tarda</i>	1	1,56
	Gamma proteobacteria	<i>Ewingella americana</i>	1	1,56v
	Bacteroidete	<i>Flavobacterium aquatile</i>	1	1,56
	Gamma proteobacteria	<i>Proteus vulgaris</i>	3	4,69
	Gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	3	4,69
	Gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	3,13
	Gamma proteobacteria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	7,81
	Gamma proteobacteria	<i>Psychrobacter immobilis</i>	1	1,56
	Beta proteobacteria	<i>Ralstonia metallidurans</i>	2	3,13
	Gamma proteobacteria	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1,56
	Gamma proteobacteria	<i>Yokonella regensburgeri</i>	1	1,56
Bacterias Gram positivas	2	9	24	37,5
	Firmicutes	<i>Bacillus spp</i>	5	7,81
	Actinobacteria	<i>Corynebacterium aquatycus</i>	1	1,56
	Firmicutes	<i>Enterococcus durans</i>	1	1,56
	Firmicutes	<i>Enterococcus faecium</i>	3	4,69
	Firmicutes	<i>Kurthia gibsonii</i>	1	
	Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	3	4,69
	Firmicutes	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	4,69
	Firmicutes	<i>Staphylococcus saprofiticus</i>	4	6,25
	Firmicutes	<i>Staphylococcus xylosus</i>	3	4,69

nezuela, se indica que en estas aguas prevalecen las bacterias Gram negativas sobre las bacterias Gram positivas (41). Similar resultado se observa en el agua del manantial mineromedicinal del balneario La Mitisús, ubicado de igual manera en Mérida Venezuela (42)

En el caso de los estudios microbiológicos realizados a las

aguas mineromedicinales españolas, se ha indicado también que en la mayoría prevalecen las bacterias Gram negativas (35,36,43,44).

En todos los estudios de microbiología de las aguas de balnearios anteriormente descritos predominaron los bacilos Gram negativos al igual que en el balneario de aguas termales Urauco, lo cual



podiera explicarse por la versatilidad metabólica que exhiben las bacterias Gram negativas que le permiten sobrevivir en ecosistemas oligotróficos mesotermiales (31,45).

Respecto a los resultados obtenidos en la identificación de las especies bacterianas aisladas, se puede señalar que el manantial es un ambiente con una gran diversidad biológica debido a la variedad de géneros y especies encontradas prevaleciendo entre ellas las bacterias de la clase gamma proteobacterias (Ver tabla 2).

Dentro de las bacterias pertenecientes a la clase gamma proteobacterias aisladas, destaca la presencia del género *Aeromonas* quien se aisló en mayor frecuencia y proporción en la piscina y en las aguas del balneario Urauco en general (Ver tabla 2).

Especies del género *Aeromonas* se han aislados en diversos manantiales de aguas termales mineromedicinales de Ecuador, España y en otros lugares del mundo (33,37,42,46).

Entre los trabajos realizados en el Ecuador donde se han aislados especies de *Aeromonas* de manera preponderante, resalta el realizado por Maca en el año 2015 en aguas termales del balneario ecológico "Santa Ana", ubicado en el cantón Baños de Agua Santa de la provincia de Tungurahua. En este estudio se pudo aislar e identificar las especies *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas media*, *Aeromonas schubertii* y *Aeromonas caviae*, en los diversos puntos de muestreos analizados (47).

Los miembros del género *Aeromonas* son bacterias cuyo hábitat principal son los ecosistemas acuáticos de agua dulce y saladas. Estas bacterias se han indicados que pueden infectar a los organismos acuáticos, así como a humanos, donde se le considera como un patógeno oportunista (48).

Otros de los géneros bacterianos pertenecientes a la clase de las gamma proteobacterias identificados en las aguas termales del balneario Urauco fueron *Budvicia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Ewingella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Vibrio* y *Yokonella* (Ver tabla 2).

Los géneros antes mencionados pertenecientes a la clase de las gamma proteobacterias han sido aislados en diversos tipos de ecosistemas acuáticos, tanto de aguas dulces como de aguas minerales naturales y termales en diferentes lugares del mundo (1,30,36,37,42,45).

En Ecuador Ibaza en el año 2018 señala la presencia de bacteria de los géneros *Aeromonas*, *Budvicia*, *Citrobacter*, *Ewingella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* en las aguas termales del balneario de "Santagua de Chachimiro" en la Provincia de Imbabura. Resultado muy similar al obtenido en la presente investigación (29).

Las bacterias del género *Vibrio* han sido observadas como parte de la microbiota autóctona en diversos manantiales de aguas mineromedicinales ya que resisten una elevada osmolaridad dado a que poseen complejos mecanismos de regulación interna (49).

En relación con la especie de bacterias Gram negativas de los géneros *Acidovorax* y *Brevundimonas* perteneciente a las alfa proteobacterias y beta proteobacterias, respectivamente, las cuales se aislaron también de las aguas termales del balneario Urauco, se puede indicar que las mismas se han aislado de otros manantiales de aguas minerales termales, tanto de Ecuador, España y Venezuela (29,37,42,50).

En el caso de *Acidovorax delafieldi*, anteriormente conocida como *Pseudomonas delafieldi*, es una bacteria comúnmente aislada del suelo y en ocasiones del agua, así lo demostraron Guobin y colaboradores en el año 2005, aislando esta bacteria a partir de las muestras de aguas residuales del campo petrolífero Shengli en China (51).

Con respecto a las bacterias Gram positivas encontradas en el agua termal del balneario Urauco, destaca la prevalencia de microorganismos pertenecientes a la clase firmicutes, con los géneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Kurthia* y *Staphylococcus*, seguidos de individuos de las clases de Actinobacterias con los géneros *Corynebacterium* y *Micrococcus* (Ver tabla 2).

Las bacterias Gram positivas son más comunes en aguas hipertermales, aunque también se han aislados en aguas mesotermiales e incluso hipotermiales (31,45).

En el estudio de las aguas termales del balneario "Santa Ana" de Baños de Agua Santa, perteneciente a la provincia de Tungurahua, se logró identificar bacterias Gram positivas de los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Kurthia* y *Staphylococcus* (38), resultados similares a los que se pudo identificar en el presente trabajo.

De igual forma, en el estudio de la biodiversidad microbiana de las aguas termales "Santagua de Chachimiro" en la Provincia de Imbabura, se logró aislar e identificar de bacterias Gram positivas de las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thuringiensis* y *Micrococcus lylae* (29), resultado coincidente con el obtenido en las aguas del balneario Urauco.

En cuanto al género *Bacillus*, estas bacterias provienen del suelo de donde pasan al agua, aunque son más comunes en aguas hipertermales también crecen en aguas meso termales como es el caso del agua del Balneario Urauco y han sido también señaladas en aguas mineromedicinales mesotermiales de España (17,33,34,35,36).

Bacterias del género *Bacillus* se han involucrado en procesos biotecnológico de producción de metabolitos con diversas aplicaciones biotecnológicas e industriales, lo cual sería de mucho interés económico (14,15,16).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio microbiológico evidencian que el agua termal del balneario Urauco, ubicado en la Provincia de Pichincha Ecuador, presenta una cantidad moderada de bacterias heterótrofas lo cual estaría indicando potenciales proble-



mas de protección de los acuíferos y de contaminación microbiana por parte del medio ambiente circundante.

Por otra parte, la presencia de bacterias Gram negativas de la clase gamma proteobacterias indican que en Ecuador también se observa, como en España y otros países latinoamericanos, la prevalencia de este tipo de microorganismos en las aguas mineromedicinales mesotermales.

Se ha logrado obtener la identificación de 64 cepas de bacterias pertenecientes a 26 especies dentro de 20 géneros bacterianos, lo cual indica una alta biodiversidad bacteriana para las aguas del balneario Urauco.

En el futuro inmediato, debe llevarse a cabo la metagenómica de estos ecosistemas, así como la construcción de una colección de cultivos para la conservación y mantenimiento de cepas microbianas aisladas, así como el diseño de metodologías para el uso de estos microorganismos en la biorremediación y procesos biotecnológicos.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al financiamiento obtenido por parte de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador a través del proyecto No. 11 y del Instituto de Investigaciones de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba-Ecuador.

6. REFERENCIAS

- Andueza, F. (2007). Diversidad Microbiana de las Aguas Mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Sánchez Granjel, L. (1981). La medicina española antigua y medieval. Ed. Universidad de Salamanca. Salamanca. España
- Rodríguez, L. (1995). Estudio histórico bibliográfico del termalismo. Ed. Diputación Provincial. Orense. España.
- Limón Montero, A. (1697). Espejo cristalino de las aguas de España. Alcalá de Henares. Reproducción facsímil. Ed. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid.
- Armijo, M. (1968). Compendio de Hidrología Médica. Ed. Científico Médica. Barcelona. España.
- Armijo, M; San Martín, J. (1994). Curas balnearias y climáticas: talasoterapia y helioterapia. Editorial Complutense. Madrid. España
- De la Rosa, MC.; Mosso, MA. (2004). Historia de las aguas mineromedicinales en España. Observatorio medioambiental. N.º 7: 117-137.
- Álamo, F. (1893). Aguas minerales y termales de Venezuela. El Cojo Ilustrado, Caracas. Vol. 2 (40): 296-300.
- Burbano, N., Becerra, S., y Pasquel, E. (2013). Aguas termo minerales en el Ecuador. INAMHI. Quito. Ecuador.
- Carrera, D.; Guevara, P. (2016). Fuentes termales del Ecuador. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Quito. Ecuador.
- Maldonado-Eraza, C.P., Álvarez-García, J., Del Río-Rama. M.C., & Durán-Sánchez, A. (2017). Ruta del agua-Yaku Nambi en la Amazonia Ecuatoriana. *Tourism and Hospitality International Journal*, 9(2): 87-112.
- Gianfaldoni, S.; Tchernev, G.; Wollina, U.; Rocchia, M.; Fioranelli, M.; Gianfaldoni, N.; Lotti, T. (2017). History of the Baths and Thermal Medicine. *Maced. J. Med. Sci.* Vol. 5(4): 566-568.
- Villegas, M. (2018). Medicina ancestral como recurso para potenciar el desarrollo del turismo de salud y bienestar: caso comunidad Shuar, Ecuador. Tesis pregrado. Universidad de Guayaquil. Guayaquil. Ecuador.
- Ramírez, N.; Serrano, J.; Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 37 (3): 56-71.
- Medina-Ramírez, G.; Naranjo, K.; Escobar, S.; Araque, J.; Djabayan, P.; Andueza, F. (2017). Microbiota extremófila y resistomas ambientales de la fuente termal "Termas La Merced". Quito. Ecuador. FIGEMPA: Investigación y desarrollo. Vol. 2 (7): 33-38.
- Viviano, F.; Medina, L.; Ramos, N.; Anaís, L.; Valbuena, O. (2011). Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela. *Rev. Latinoam. Biotechnol. Amb. Algal.* Vol. 2 (1):18—29
- De la Rosa, MC.; Andueza, F.; Sánchez, M.; Rodríguez, C.; Mosso, M. (2004). Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* Vol. 7 (extraordinario): 51-74.
- Andueza, F.; Albuja, A.; Arguelles, P.; Escobar, S.; Espinoza, C.; Araque, J.; Medina, G. (2015). Antimicrobial resistance in strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from termal waters at Chimborazo, Ecuador. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.* Vol. 81(2): 158-163.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma. NTE INEN 2169, (2013) Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito. Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma NTE INEN 2176, (2013) Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito. Ecuador.
- American Public Health Association (APHA), (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.
- Reasoner, D.J.; Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 49: 1-7.
- Boletín Oficial de Estado Español (2003). Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero sobre Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Gobierno de España. BOE 45: 7228-7245.
- Barrow, G.; Feltham, R. (2004) Manual for the identification of medical bacteria. Edición 3, Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- MacFaddin, J. (2004). Pruebas Bioquímica individuales. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a ed. Buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana.



26. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Shape, M. and Holt, J. (1986). *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. II. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. USA.
27. Holt, J.G.; Krieg, N.; Sneath, D.; Slaley, J.; Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. USA.
28. Garrity, G.; Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. Springer. New York. USA.
29. Ibaza, D. (2018). Biodiversidad microbiana de las aguas termales "Santagüa de Chachimbiro" en la Provincia de Imbabura: Búsqueda de microorganismos con propiedades biotecnológicas. Tesis de pregrado. Escuela de Ingeniería Ambiental. Facultad FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador.
30. Talavera, Andrea. (2019). Biodiversidad microbiana de las aguas termales del balneario Cununyacu y sus posibles propiedades Biotecnológicas. Trabajo de titulación pregrado. Carrera de Ingeniería Ambiental. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador.
31. De La Rosa, M.C.; Mosso, M.A. (2000). Diversidad microbiana de las aguas minerales termales. En: *Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales de España*, pp. 153-158. Ed. A. López y J.L. Pínuaga. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid. España.
32. Gobierno de Canarias (1989). *Boletín Oficial de Canarias* No. 38. Pp. 532-538. Canarias. España.
33. De la Rosa, M.; Pintado, C.; Rodríguez, C. y M. Mosso, (2009). Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Alicún de las Torres. *Rev. Anal. Real Acad. Farm.* Vol. 75 (E): 763-780.
34. Mosso, M.; Sánchez, M. y M. De La Rosa, (2006). Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios Cervantes. *Anal. Real Acad. Farm.* Vol. 73 (E): 285-304.
35. De la Rosa, C.; Pintado, C.; Fernández, V.; Rodríguez, C. (2017). Microbiología del aguamineromedicinal del Balneario de San Nicolás. *Anal. Real. Acad. Farm.* Vol. 83, (Special Issue): 63-78.
36. De la Rosa, C.; Fernández, V.; Pintado, C.; Rodríguez, C. (2018). Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Paracuellos de Jiloca. *An.Real.Acad.Farm.* Vol. 84, (Special Issue): 68-80.
37. Naranjo, C. (2015). Estudio Microbiológico del manantial termal del Balneario "Termas La Merced" ubicado en la parroquia La Merced perteneciente a la provincia de Pichincha. Tesis pregrado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador
38. Andueza, F.; Jacome, A.; Cortez, S.; Medina, G.; Arciniegas, S.; Parra, Y.; Araque, J. (2018). Microbiota del agua termal del balneario "Piscinas El Cachaco", Calacalí, Provincia del Pichincha. Ecuador. *Anal. Real. Acad. Farm.* Vol. 84 (4): 247-254
39. Sacoto, D. (2019). Microbiota del agua termal del balneario Ilaló en la Provincia de Pichincha-Ecuador y sus propiedades Biotecnológicas e Industriales. Trabajo de titulación. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador
40. Jacho, K. (2015). Estudio microbiológico del manantial termal del Balneario Rumiloma de la parroquia Guangopolo perteneciente a la provincia de Pichincha. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador
41. Flores, S. (2012) Aislamiento, identificación y detección de microorganismos con actividades biológicas procedentes de las aguas de los manantiales termales, La Mitisus y Santa Apolonia del Estado Mérida. Tesis de Maestría. Postgrado de Química de medicamentos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.
42. Gutiérrez, MG.; Andueza, F.; Araque, J.; Lugo, A.; Chacón, Z. (2018). Caracterización microbiológica y potencial biotecnológico de microorganismos aislados de las aguas termales de la Musuy, Municipio Rangel del Estado Mérida. Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Vol. 38 (1): 27-32.
43. De la Rosa, M.; Sánchez, M.; Rodríguez, M. & M. Mosso, (2007). Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo. *Anal. Real Acad. Farm.* Vol. 73: 251-265.
44. De la Rosa, M.; Pintado, C.; Rodríguez, C. & M. Mosso, (2009). Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Alicún de las Torres. *Anal. Real Acad. Farm.* Vol. 75 (E): 763-780.
45. Leclerc, H.; Da Costa (2004). *Microbiology of natural mineral waters*. In: *Technology of Bottled water*. 2th Ed. (Ed. Senior and Dege). Blacwell. Publishing. Boston. USA.
46. Andueza Leal, F.; Aguirre, M.; Arciniegas, S.; Parra, Y.; Escobar, S.; Medina, G.; Araque, J. (2018). Calidad bacteriológica del agua de los manantiales termales del balneario "Santa Ana" Cantón Baños, Tungurahua, Ecuador. *Rev. Perspectiva*. Vol. 19 (4), 2018: 529-53.
47. Macas, P. (2015). Estudio microbiológico de las aguas termo-minerales del Balneario "Santa Ana" de Baños de Agua Santa-Tungurahua. Tesis de pregrado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador
48. Gonçalves, R.; De Oliveira, W.; Santa Clara, D.; Dos Santos, M.; Matoso, E.; De Carvalho, M.; Barroso, L. (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial pathogenesis*. Vol. 130: 81-94.
49. Zabala, A.; Quiñonez, E.; Vázquez, C. (2005). La vida oscura del *Vibrio alginolyticus*. *Revista digital universitaria*. Vol. 6 (4): 3-7.
50. Pal, D.; Kaur, N.; Sudan, S.; Bisht, B.; Krishnamurthi, S.; Mayilraj, S. (2018). *Acidovorax kalamii* sp. nov., isolated from a water sample of the river Ganges. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 68 (5): 1719-1724.
51. Guobin, S.; Jianmin, X.; Chen, G.; Huizhou, L.; Jiayong, C. (2005). Bio-sulfurization using *Pseudomonas delafieldi* in magnetic polyvinyl alcohol beads. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 40: 30.



11. DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA.

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en el presente artículo.

Si desea citar nuestro artículo:
Félix Andueza Leal; Judith Araque; Et. al.
Bacterial biodiversity in mineromedicinal waters of spa
"urauco". Pichincha. Ecuador.
An Real Acad Farm (Internet).
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 19 - 28

MVA-B COMO CANDIDATO VACUNAL FRENTE AL VIH/SIDA: DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LOS ENSAYOS CLÍNICOS PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO

MVA-B AS HIV/AIDS VACCINE CANDIDATE: FROM BASIC SCIENCE TO PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC CLINICAL TRIALS

Carmen Elena Gómez Rodríguez¹

¹Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Departamento de Biología Molecular y Celular.

*corresponding author: cegomez@cnb.csic.es

Sent: February 1, 2020 | Reviewed: March 1, 2020 | Accepted: March 15, 2020. | Language of Manuscript: Spanish

anranf.2020.86.

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 - 60

ORIGINAL

RESUMEN

El virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) ha alcanzado la madurez como sistema de administración de antígenos y como candidato vacunal frente a un amplio espectro de enfermedades infecciosas gracias al conocimiento derivado de las investigaciones sobre la interacción entre el virus y la célula hospedadora, el perfil de expresión génica que estimula, la distribución tras su inoculación y la inmunogenicidad mostrada en ensayos preclínicos y clínicos. En esta revisión, se engloban las principales aportaciones que hemos realizado desde el conocimiento básico de la biología del vector MVA, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con la cepa atenuada NYVAC, hasta su evaluación como candidato vacunal frente al VIH/SIDA en ensayos clínicos. Detallaremos la generación y caracterización del vector recombinante MVA que expresa los antígenos Env, Gag, Pol y Nef del subtipo B del VIH-1 (denominado MVA-B) y revisaremos los datos preclínicos que respaldaron la evaluación de MVA-B como la primera vacuna profiláctica y terapéutica frente al VIH-1 ensayada en humanos en España. Además, valoraremos los resultados de los ensayos clínicos y discutiremos las líneas de investigación en las que estamos trabajando actualmente considerando los últimos avances científicos en el campo de vacunas frente al VIH.

ABSTRACT

The highly attenuated poxvirus strain modified vaccinia virus Ankara (MVA) has reached maturity as antigen delivery system and as a vaccine candidate against a broad spectrum of infectious diseases. This has been largely recognized from research on virus–host cell interactions, gene expression profiling, virus distribution and immunological studies in preclinical and clinical trials. This review includes our main contributions from the basic knowledge of the biology of the MVA vector, both in vitro and in vivo, in comparison with the attenuated NYVAC strain, to its evaluation as a vaccine candidate against HIV/AIDS in clinical trials. We will detail the generation and characterization of the recombinant poxvirus vector MVA expressing the HIV-1 Env, Gag, Pol and Nef antigens from clade B (referred as MVA-B) and review the preclinical data that supported the evaluation of MVA-B as the first in human HIV-1 prophylactic and therapeutic vaccine in Spain. In addition, we will assess the results of clinical trials and discuss the research projects we are currently working on considering the latest scientific advances in the HIV vaccine field

Palabras Clave:

VIH
SIDA
vacunas
poxvirus
MVA
NYVAC
inmunogenicidad
ensayos clínicos

Keywords:

HIV
AIDS
vaccines
poxvirus
MVA
NYVAC
immunogenicity
clinical trials



1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han supuesto un gran reto en cuanto a morbilidad, mortalidad y secuelas para la humanidad a través de los siglos. A pesar de los enormes avances científicos y tecnológicos logrados en materia de prevención y tratamiento, la lucha frente a estas enfermedades continúa hoy en día más viva que nunca. La emergencia o reemergencia de ciertas enfermedades infecciosas constituye un hecho de gran relevancia en la actualidad. El elevado crecimiento demográfico, el comercio internacional, una educación en materia sanitaria insuficiente, los desplazamientos poblacionales como consecuencia de conflictos, pobreza y guerras locales, el cambio climático y las inestabilidades sociales, configuran diferentes caras de la globalización creando las condiciones óptimas para que enfermedades infecciosas que estaban confinadas en determinadas zonas geográficas, se puedan encontrar en la actualidad en cualquier punto del planeta y transmitirse rápidamente provocando una epidemia global.

Desde comienzos del siglo XXI, la salud pública a nivel mundial se ha visto profundamente amenazada no solo por la emergencia de nuevos patógenos, entre los que destacan el coronavirus asociado al síndrome respiratorio grave y agudo (SARS-Co), el virus de la gripe A H1N1, las cepas de gripe aviar A H5N1 y H7N9 o el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), sino también por la emergencia de patógenos conocidos como el virus de Zika, el virus del Dengue, el virus de Chikungunya, el virus de Marburgo o el virus del Ébola tanto en zonas endémicas como no endémicas. Además, la aparición de brotes de enfermedades prevenibles como el cólera, la poliomielitis o el sarampión como consecuencia del descenso en las coberturas de inmunización en países que llevaban años libres de ellas, junto con la presencia de enfermedades históricas como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la Hepatitis C, la tuberculosis o la malaria, complican aún más el panorama sanitario internacional. Dada la relevancia de estas enfermedades, el Fondo Mundial (Global Fund) se marcó el objetivo de conseguir 14.000 millones de dólares para luchar contra el VIH, la malaria y la tuberculosis, habiendo alcanzado en octubre de 2019 la cifra de 13.000 millones de dólares, lo que constituye un logro de cooperación internacional. España aportará 100 millones de euros.

Las estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) referentes al número de afectados por los diferentes brotes y su expansión territorial reflejan la vulnerabilidad que existe frente a los patógenos emergentes a nivel global y representan un motivo de preocupación tanto para los organismos de salud pública como para la comunidad científica, ya que muchas de las enfermedades infecciosas a las que nos enfrentamos actualmente presentan una patogénesis desconocida y carecen de tratamientos efectivos tanto para su prevención como para su cura. Unido a esto, tampoco puede descartarse el peligro que supone la elevada tasa de mutación y recombinación

que poseen estos agentes patógenos, lo que les permite derivar en nuevas variantes capaces de franquear la barrera inter-específica y trasladarse de su reservorio habitual a otros reservorios, modificar su modo de contagio o aumentar su grado de virulencia, pudiendo provocar consecuencias nefastas sobre la salud humana. No cabe duda que hoy en día los problemas sanitarios están mejor definidos que hace dos décadas, que existe una colaboración nacional e internacional más estrecha a la hora de tratar cuestiones claves para la salud y que se dispone de un mayor conocimiento, medios y capacidad para abordar problemas emergentes. Sin embargo, queda aún mucho camino por recorrer.

La innovación científica en los últimos años ha transformado nuestra capacidad para enfrentar los retos que suponen las infecciones emergentes y reemergentes. Hoy en día contamos con un amplio abanico de nuevas y sofisticadas tecnologías que permiten grandes progresos en la detección y control potencial de enfermedades infecciosas entre las que destacan la secuenciación genómica avanzada, la proteómica, la bioinformática, la biología estructural, la epigenómica y la biología de sistemas. A pesar de que el diagnóstico y el tratamiento temprano de las infecciones tienen una influencia directa sobre la incidencia de transmisión, la prevención basada en vacunas representa la estrategia más efectiva a largo plazo. Debido a esto, se han ido introduciendo en este campo las nuevas tecnologías con el fin de ir modificando los conceptos aplicados hasta ahora con las vacunas disponibles y adaptarlas a los requerimientos de los patógenos a los que nos enfrentamos actualmente y para los cuales no existe una vacuna preventiva eficaz.

El grupo de poxvirus y vacunas liderado por el Dr. Mariano Esteban en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), representa un pilar importante en España dentro del campo de la investigación y generación de candidatos vacunales frente a enfermedades infecciosas utilizando como plataforma cepas altamente atenuadas del virus vaccinia (VACV). Con más de 300 publicaciones originales en revistas arbitradas, este grupo ha realizado importantes aportaciones en los campos de la virología, la inmunología y la vacunología. Desde mi incorporación en el año 1998 hasta la fecha, mi trabajo se ha centrado en el estudio comparativo del comportamiento y la patogénesis de las cepas altamente atenuadas del virus vaccinia MVA (virus modificado de Ankara) y NYVAC (virus vaccinia de Nueva York) con el propósito final de trasladar el conocimiento básico a la clínica a través del desarrollo de candidatos vacunales frente a enfermedades prevalentes, con énfasis en la infección causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En esta revisión llevaré a cabo una descripción temporal de las principales aportaciones que hemos realizado desde el conocimiento básico de la biología del vector MVA, tanto in vitro como in vivo, en



comparación con la cepa atenuada NYVAC, hasta su evaluación como candidato vacunal frente al VIH/SIDA en ensayos clínicos. Detallaré la generación y caracterización del vector recombinante MVA que expresa los antígenos Env, Gag, Pol y Nef del subtipo B del VIH-1 (denominado MVA-B) y revisaré los datos preclínicos que respaldaron la evaluación de MVA-B como la primera vacuna profiláctica y terapéutica frente al VIH-1 ensayada en humanos en España. Además, valoraré los resultados de los ensayos clínicos y discutiré las líneas de investigación en las que estamos trabajando actualmente teniendo como premisa los últimos avances científicos realizados en el campo de vacunas frente al VIH/SIDA.

Lógicamente, mi contribución científica se ha visto beneficiada por el liderazgo del Dr. Mariano Esteban y por la colaboración con miembros del laboratorio y con otros investigadores europeos y americanos con los que trabajamos conjuntamente en pro de la consecución de una vacuna frente al VIH. Además, la aportación económica de la Fundación Bill & Melinda Gates, Fundación Botín, Unión Europea, proyectos del Plan Nacional, Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA (FIPSE) y Red Española de Investigación en SIDA (RIS), ha contribuido sustancialmente a los avances que hemos llevado a cabo en el desarrollo de candidatos vacunales frente al VIH-1, permitiendo realizar una traslación desde la investigación básica hasta los ensayos preclínicos y clínicos.

A continuación, esbozaré como hemos ido avanzando a lo largo de los años desde el entendimiento de la biología de los virus utilizados hasta su aplicación como vacunas.

2. BIOLOGÍA DE LAS CEPAS ATENUADAS MVA Y NYVAC. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS

2.1. Poxvirus. Aspectos generales

Los poxvirus son una familia de virus ADN de gran tamaño y complejidad, capaces de infectar tanto vertebrados como invertebrados. El miembro más estudiado de esta familia es el virus vaccinia (VACV) (1); sin embargo, el más conocido es el virus de la viruela humana, causante de una de las enfermedades más devastadoras que ha conocido el hombre a lo largo de su historia y, a su vez, la única enfermedad hasta el momento combatida mediante vacunación a escala mundial y declarada erradicada oficialmente por la OMS en el año 1980.

Una de las características que distingue a los poxvirus de otros virus ADN es que permanece en el citoplasma de la célula infectada durante todo el ciclo infeccioso (Figura 1).

La replicación viral es un proceso complejo, altamente conservado y en cascada en el que se distinguen 3 fases de síntesis de ARN mensajeros y de proteínas virales que se diferencian temporalmente en tempranas, intermedias y tardías (2). Después de la entrada y des-

encapsidación del virus, se produce la transcripción de los genes tempranos que codifican proteínas que intervienen en la modulación de los mecanismos de defensa de la célula, en la replicación del ADN y en la transcripción de genes intermedios. La replicación del ADN tiene lugar en áreas del citoplasma denominadas factorías virales y ocurre durante las dos primeras horas tras la entrada del virus. Como consecuencia de dicha replicación, se generan unas 10000 copias del genoma viral por célula de las que solo la mitad llega a empaquetarse. En la etapa intermedia se transcriben proteínas implicadas en la transcripción de genes tardíos que, a su vez, codifican proteínas estructurales del virión y enzimas necesarias para la transcripción de los genes tempranos que también se incorporan en la partícula viral. Una vez replicado el ADN y sintetizadas todas las proteínas virales, comienza el proceso de morfogénesis que ocurre en varias etapas e involucra la producción de diferentes formas virales. Este proceso comienza con la formación de crestas membranosas que rodean un material electrodensito que contiene el ADN viral y las proteínas del core, dando lugar a la formación de estructuras esféricas denominadas virus inmaduros (IVs, "Immature Virus"). A continuación, tiene lugar la proteólisis y condensación del core viral, transformando los IVs en viriones intracelulares maduros (MVs, "Mature Virus") que representan las primeras formas infectivas del VACV. Una proporción de los MVs son transportados a través de microtúbulos desde las factorías virales hasta el transgolgi, donde adquieren una segunda membrana transformándose en virus intracelulares con envuelta (WVs, "Wrapped Virus"). Estos WVs son también transportados a través de la red de microtúbulos hasta la membrana plasmática, fusionándose con esta última y liberando al exterior virus con envuelta (EVs, "Enveloped Virus") que pueden permanecer retenidos en la superficie de la célula infectada o liberarse al medio. Los EVs retenidos en la superficie inducen la formación de colas de actina que proyectan las partículas virales fuera de la célula, permitiendo la infección célula a célula, mientras que los EVs liberados al medio facilitan la diseminación del virus a larga distancia (3).

El VACV ha contribuido al desarrollo de una parte importante de la virología moderna, ya que además de ser el primer virus animal visualizado al microscopio electrónico, crecido en cultivos celulares, purificado físicamente y analizado químicamente, fue uno de los primeros en ser utilizado como vector de expresión de antígenos heterólogos o como vacunas vivas gracias a los avances en la tecnología del ADN recombinante (4), lo que supuso una revolución en el campo de las vacunas.

Existen una serie de características únicas que hacen de los poxvirus una excelente plataforma para la generación de candidatos vacunales. Entre ellas destacan: (i) la flexibilidad de su genoma, que permite la inserción de grandes fragmentos de ADN exógeno (hasta 25 Kb) sin pérdida de infectividad; (ii) la ausencia de persistencia o integración genómica debido a su replicación citoplasmática; (iii) la

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29-60

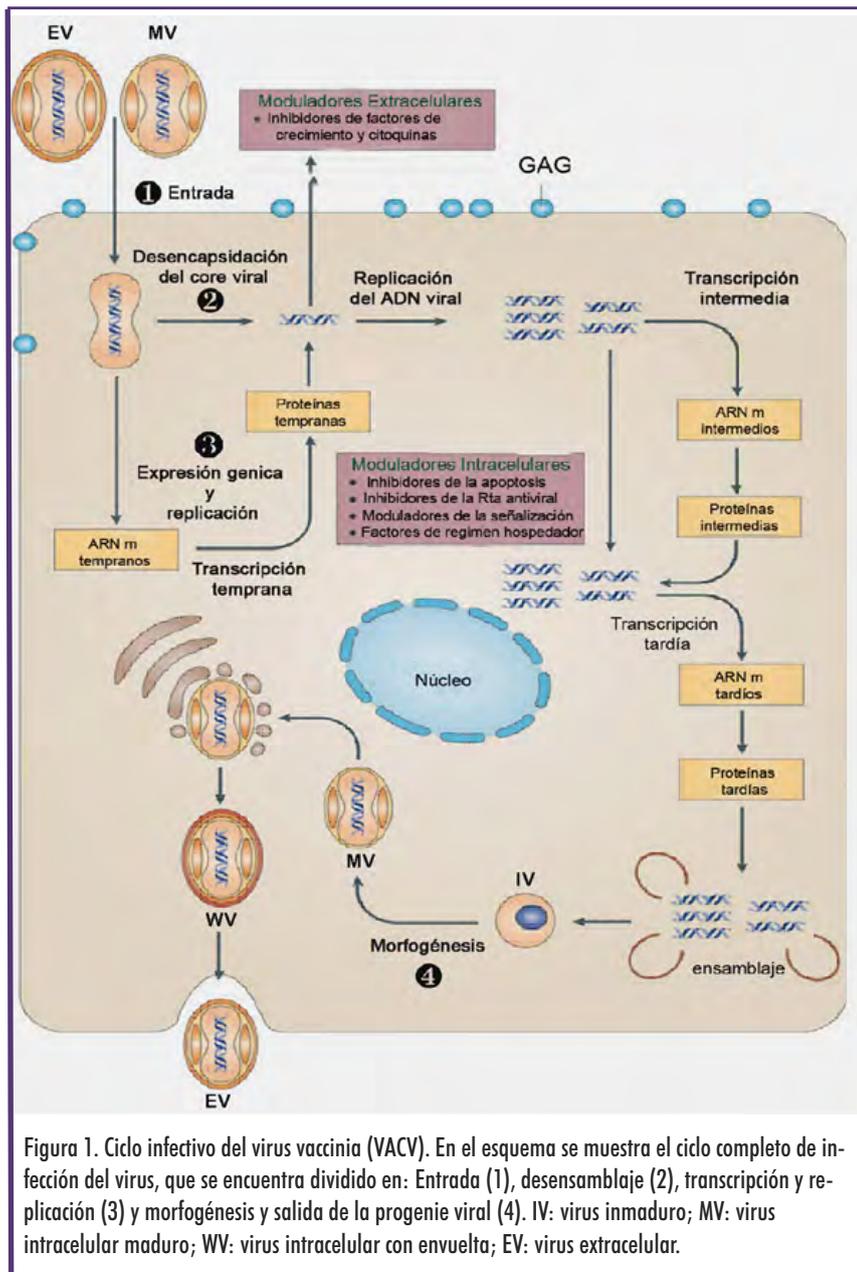


Figura 1. Ciclo infeccioso del virus vaccinia (VACV). En el esquema se muestra el ciclo completo de infección del virus, que se encuentra dividido en: Entrada (1), desensamblaje (2), transcripción y replicación (3) y morfogénesis y salida de la progenie viral (4). IV: virus inmaduro; MV: virus intracelular maduro; WV: virus intracelular con envuelta; EV: virus extracelular.

facilidad para generar virus recombinantes altamente estables que expresen niveles elevados del transgen; (iv) la capacidad de inducir una potente respuesta inmune tanto humoral como celular con inmunidad duradera tras una única inoculación; (v) la baja prevalencia en la población mundial de inmunidad frente al vector por la interrupción de la vacunación frente a la viruela en los años 70; (vi) la estabilidad del producto liofilizado, su bajo coste, facilidad de producción, distribución y administración a nivel global; y (vii) la disponibilidad de cepas altamente atenuadas incapaces de replicar en células humanas como MVA y NYVAC.

El virus modificado de Ankara se derivó de la cepa vaccinia Ankara corioalantoidea (CVA), utilizada en Turquía como vacuna frente a la viruela, tras más de 570 pases sucesivos en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEFs, "Chicken Embryo Fibro-

blasts"). Durante el curso de su generación, perdió un 15 % del genoma parental y, como consecuencia, su capacidad para replicar en células humanas y en la mayoría de células de mamífero. En 1998, Antoine y colaboradores publicaron la secuencia completa de MVA. Su genoma contiene 178 Kb frente a las 208 Kb de su cepa parental. Se han mapeado 193 ORFs (fases de lectura abierta) que corresponden a 177 genes, 25 de los cuales están parcialmente deletados y/o han sufrido mutaciones dando lugar a proteínas truncadas (5). Estos genes codifican mayoritariamente proteínas inmunomoduladoras responsables de contrarrestar la respuesta antiviral de la célula hospedadora, proteínas que determinan el rango de hospedador y proteínas estructurales que controlan la morfogénesis viral. Esta cepa se utilizó como vacuna profiláctica durante las últimas décadas de la campaña de erradicación de la viruela en Alemania en más de 120000 individuos sin presentar ninguna complicación, incluso en pacientes inmunodeprimidos, avalando su seguridad como vector vacunal.

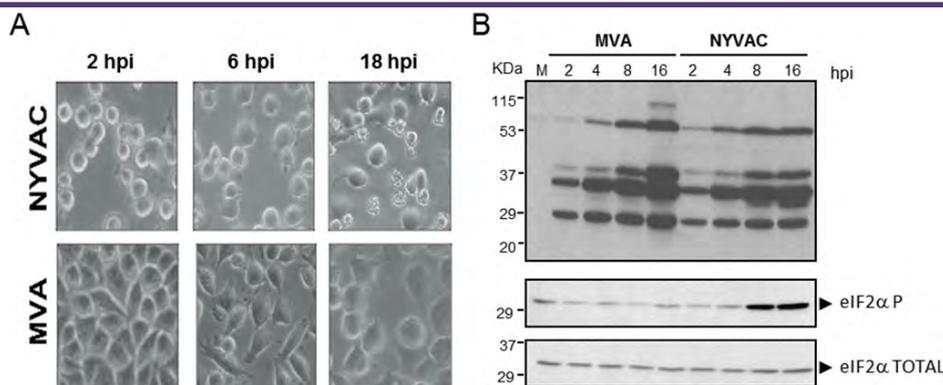
A diferencia de MVA que sufrió un proceso de atenuación clásica, la cepa NYVAC fue generada mediante la delección selectiva de genes. En la década de los 90, Tartaglia y colaboradores eliminaron del genoma de la cepa Copenhagen del virus vaccinia (VACV-COP) 18 genes no esenciales mediante ingeniería genética. Los genes deletados codifican proteínas implicadas en virulencia, patogenicidad e interacción con la célula hospedadora. El resultado de este proceso fue la obtención de un virus atenuado, con una capacidad reducida de replicación en un amplio rango de células de mamífero, entre las que se incluyen las de origen humano, y altamente seguro cuando se administró en ratones inmunodeprimidos (6).

Debido al interés progresivo que existe en la aplicación clínica de estas cepas altamente atenuadas de poxvirus como candidatos vacunales frente a un abanico de enfermedades infecciosas y cáncer, la primera parte de esta revisión se centrará en describir los principales hallazgos que hemos realizado durante los últimos años para ampliar el conocimiento sobre el comportamiento y la patogénesis de las cepas MVA y NYVAC tanto in vitro como in vivo, y para definir el perfil de seguridad e inmunogenicidad que inducen los virus recombinantes basados en ellas en diferentes modelos animales. A su vez, resaltaremos las principales estrategias que hemos explorado, basándonos en el conocimiento básico generado, para optimizar la capacidad inmunogénica de ambos vectores.

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 - 60



Figuras 2. Comportamiento diferencial de MVA y NYVAC en células de origen humano (HeLa) a diferentes tiempos post-infección. A: Efecto citopático analizado mediante microscopía de contraste. B: Análisis por western-blot de la acumulación de proteínas virales (arriba) y de los niveles de fosforilación de eIF2α con respecto al total (abajo).

Estos estudios se han desarrollado en el CNB en el marco de múltiples proyectos de I + D + i financiados en convocatorias competitivas de administraciones o entidades públicas y privadas tanto nacionales como internacionales. Los resultados obtenidos se han publicado en forma de artículos originales, revisiones o capítulos de libros en revistas científicas relacionadas con virología, inmunología o desarrollo de vacunas, como se detalla en la bibliografía. Esta investigación también formó parte de la memoria titulada "Caracterización in vitro e in vivo de los vectores atenuados de poxvirus MVA y NYVAC como candidatos vacunales frente al VIH/SIDA" presentada bajo mi codirección por el estudiante José Luis Nájera García, para optar al grado de Doc-

tor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid en el año 2007. La tesis fue calificada con sobresaliente cum laude y obtuvo el premio Juan Abelló Pascual, concedido por la Real Academia de Doctores de España.

2.2. Comportamiento in vitro de las cepas MVA y NYVAC

Si bien algunos aspectos del comportamiento de MVA en diferentes tipos celulares habían sido reportados con anterioridad a nuestros estudios (7), poco se sabía sobre la biología o el comportamiento de NYVAC en células en cultivo. Para ampliar este conocimiento realizamos un estudio comparativo de los efectos que producía la infección

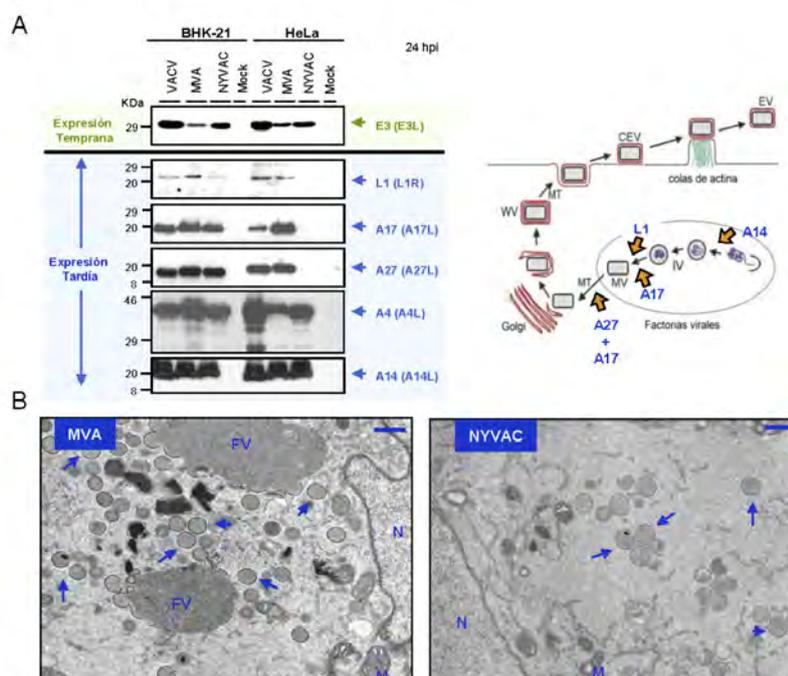


Figura 3. Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la morfogénesis de MVA y NYVAC. A: Análisis por western-blot de la expresión de proteínas virales tempranas y tardías en condiciones permisivas (BHK-21) y no permisivas (HeLa). A la derecha se esquematizan los diferentes estadios del ciclo viral en los que están implicadas algunas de las proteínas virales tardías que participan en el proceso de morfogénesis de VACV. B: Microscopía electrónica de células HeLa infectadas con MVA o NYVAC. La barra situada en la esquina superior derecha de cada panel indica la magnificación de cada fotografía (500 nm). N: núcleo; M: mitocondria; FV: factoria viral. Las flechas indican los viriones inmaduros (IVs).

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

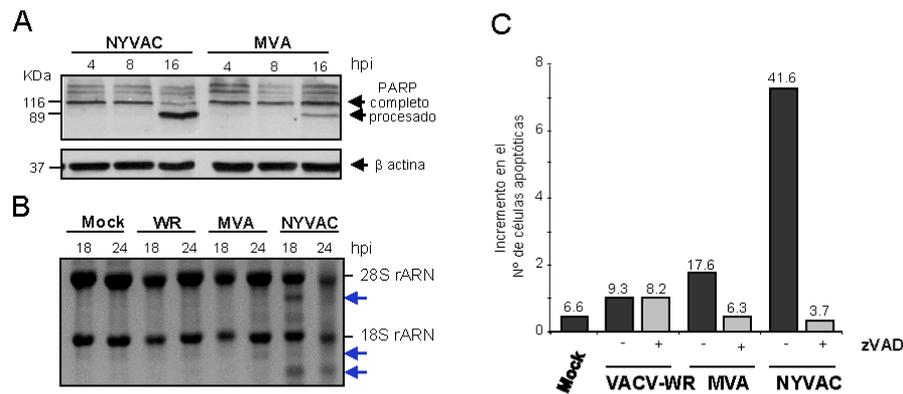


Figura 4. Inducción de muerte celular por apoptosis tras la infección viral. A: Análisis por western-blot del procesamiento de la proteína celular PARP. B: Degradación del ARN ribosomal. Las flechas indican los productos de degradación de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosómico. C: Cuantificación de la apoptosis mediante citometría de flujo en presencia (+) o ausencia (-) de zVAD. El porcentaje de células apoptóticas para cada condición se muestra en la parte superior de cada barra.

por MVA o NYVAC en cultivos primarios de CEF o células de riñón de hámster recién nacido (BHK-21) (líneas celulares permisivas) o en cultivos de células de origen humano o murino (no permisivas).

Los resultados de este trabajo, publicados en la revista "J. Virol." (8), confirmaron que MVA y NYVAC eran incapaces de replicar de forma productiva en células no permisivas, mientras que exhibían cinéticas de replicación similares en condiciones permisivas. No obstante, observamos un comportamiento diferencial entre ambas cepas que podría influir sobre la capacidad inmunogénica de ambos vectores vacunales (Figuras 2 y 3).

Entre las principales diferencias encontradas destacan: (i) NYVAC produce un efecto citopático (EC) más severo que el producido por MVA desde tiempos muy tempranos y en un amplio rango de células, tanto permisivas como no permisivas, lo que indica que es un efecto independiente de la restricción del hospedador (Figura 2A); (ii) en condiciones permisivas el rendimiento de virus asociado a células obtenido tras la infección por NYVAC es inferior al obtenido en células infectadas por MVA. Esta reducción podría estar relacionada con el marcado efecto citopático asociado a la infección por NYVAC y podría explicar las dificultades encontradas por algunos grupos para producir altos títulos de recombinantes basados en este vector; (iii) la infección por NYVAC en condiciones no permisivas produce un bloqueo traduccional que se encuentra asociado a un incremento significativo en los niveles de fosforilación de la subunidad alfa del factor eIF2 (eIF2 α) (Figura 2B) y que afecta a la expresión de ciertas proteínas virales tardías, algunas de ellas implicadas en el proceso de maduración de los viriones, como las proteínas estructurales A27, A17 o L1 (Figura 3A). Como consecuencia de esto, el bloqueo en la morfogénesis ocurre antes o durante la formación de los viriones inmaduros (IVs) (Figura 3B).

Esto difiere de lo que nuestro grupo había reportado previamente en relación a la infección por MVA, donde la expresión de proteínas virales tempranas y tardías ocurre de forma similar a como se produce en células permisivas, pero existe un bloqueo en el proceso de morfogénesis, posterior a la formación de los IVs (9, 10); y (iv) a

diferencia de MVA, NYVAC induce en las células infectadas potentes cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la muerte por apoptosis, un fenómeno que demostramos depende de la activación de las caspasas (cisteín-proteasas) y de la ARNasa L (Endorribonucleasa L). La activación de las caspasas se demostró mediante la detección por western-blot de la forma procesada de la proteína celular PARP (Poly (ADP-Ribosa) Polimerasa) (Figura 4A), mientras que la activación de la ARNasa L se verificó por el patrón de degradación de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosómico (Figura 4B). La magnitud de la apoptosis fue cuantificada por citometría de flujo, detectándose un 42 % de células con fenotipo apoptótico tras 24 horas de infección por NYVAC frente al 17 % detectado tras la infección por MVA (Figura 4C).

Muchas de las diferencias observadas in vitro entre MVA y NYVAC se vieron reflejadas en el patrón de expresión génica que inducían ambas cepas en células dendríticas derivadas de monocitos humanos inmaduros (MDDC) y que fue analizado utilizando la tecnología de microarrays (11). De los 544 genes diferencialmente regulados por la infección, 283 eran regulados específicamente tras la infección por MVA. Ambos vectores regulan al alza genes que codifican para citoquinas, quimioquinas y moléculas implicadas en la captación y procesamiento de antígenos, incluidos los genes del complejo principal de histocompatibilidad, lo que resalta la capacidad que poseen ambos vectores para activar los mecanismos de inmunidad innata. No obstante, la activación que promueve MVA, tanto en número de genes como en niveles de expresión, es significativamente superior a la que promueve NYVAC. Por ejemplo, los niveles de ARNm que codifican las proteínas IL-12 β , IFN- β y TNF- α aumentaron cinco veces o más tras la infección por MVA en comparación con la infección por NYVAC, mientras que los niveles de expresión de IL-1 α e IL-1 β aumentaron solo tras la infección por NYVAC. Del mismo modo, aunque ambos virus regularon de manera similar los perfiles de expresión de factores de transcripción tales como NF- κ B y STAT, el aumento en la expresión de

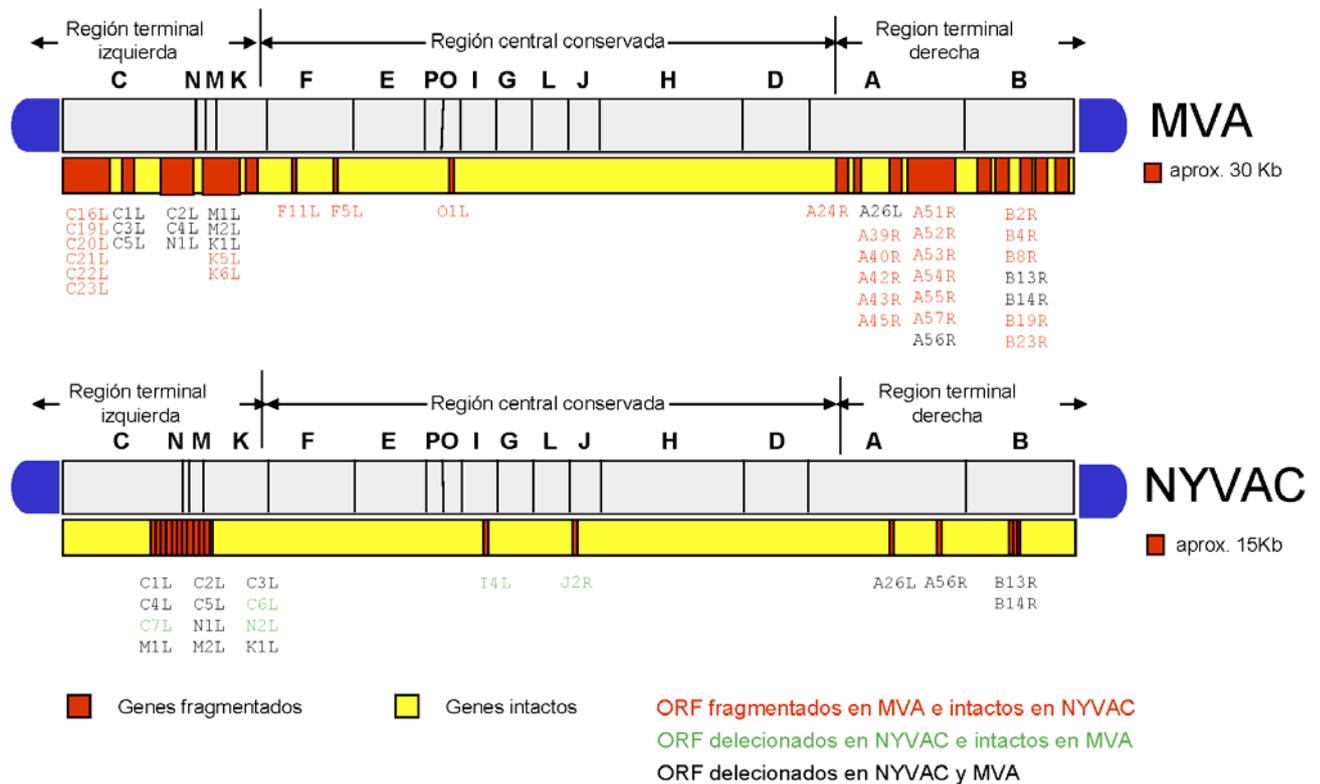


Figura 5. Análisis comparativo de los genomas de MVA y NYVAC. Los genes han sido nombrados según la nomenclatura correspondiente a la cepa Copenhagen propuesta por Goebel y cols., 1990 (78).

los genes OASL, MDA5 y RIG-I, implicados en la respuesta antiviral, fue exclusivo de la infección por MVA.

Estas diferencias observadas en el comportamiento de MVA y NYVAC en células en cultivo se atribuyen fundamentalmente a las numerosas deleciones y mutaciones que se introdujeron en sus respectivos genomas durante el curso de su atenuación (Figura 5). Por ello, decidimos realizar un estudio comparativo de los genomas de MVA y NYVAC con la finalidad de identificar algún factor viral que pudiera ser el responsable de las diferencias observadas entre ambos vectores.

Existen 5 genes ausentes en el genoma de NYVAC que están intactos en el de MVA: C6L, C7L, N2L, I4L y J2R. Entre ellos seleccionamos el gen C7L como uno de los posibles genes responsables del comportamiento diferencial entre ambas cepas. Este gen se encuentra altamente conservado dentro del género orthopoxvirus, tiene expresión temprano-tardía y se ha definido como un gen de rango de hospedador necesario para la replicación del virus en células humanas (12, 13).

Para determinar si el gen C7L podría ser el responsable del comportamiento diferencial observado, decidimos reintroducirlo en el genoma de NYVAC generando para ello el virus recombinante NYVAC-C7L. La reinserción del gen C7L es capaz de prevenir la fosforilación del factor eIF2 α y la degradación del ARN ribosomal, lo que se traduce en un rescate de la expresión de las proteínas virales tardías cuya síntesis se encontraba inhibida en la infección por NYVAC (A17, A27 o L1). Como consecuencia de esto, el nuevo vector recupera la capacidad

para crecer en células humanas y murinas. Del mismo modo, la expresión de la proteína C7 inhibe la apoptosis que se induce tras la infección con la cepa parental.

En estudios in vivo el recombinante NYVAC-C7L incrementó su eficiencia de replicación; sin embargo, mantuvo un fenotipo atenuado. Todos estos resultados evidenciaron que el gen C7L posee propiedades antiapoptóticas y desempeña un papel importante en el control de la síntesis de proteínas virales, dos funciones no descritas hasta el momento y que avalaron la solicitud de la patente "Vectores en los que se inserta el gen C7L y uso de los mismos en la fabricación de vacunas y de composiciones para terapia génica", inscrita en España con número de solicitud P2006601240 y cuya entidad titular de derechos es el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

2.3. Interacción virus-célula hospedadora

Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren de la maquinaria metabólica celular para replicarse. El reconocimiento del virus por la célula hospedadora desencadena una serie de eventos inmediatos y no-específicos que promueven la producción de interferones (IFNs), genes estimulados por IFN (ISGs, "Interferon Stimulated Genes") y citoquinas pro-inflamatorias, y cuyo objetivo es resolver la infección viral. Este reconocimiento viral se lleva a cabo por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, "Pattern recog-

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

nition receptors”), que son proteínas codificadas en la línea germinal y que participan en el sistema inmunitario innato identificando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, “Pathogen-Associated Molecular Patterns”) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, “Damage-Associated Molecular Patterns”). Entre los PRRs mejor descritos y con implicaciones en infecciones virales se encuentran los receptores tipo toll (TLRs, “Toll-Like Receptors”), los receptores tipo RIG-I (proteína inducible por ácido retinoico) (RLRs, “Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors”) y los receptores tipo NOD (proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos) (NLRs, “Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors”). Estas moléculas se expresan en los macrófagos, en las células del epitelio pulmonar y en las células reclutadas del sistema inmune, aunque también se han encontrado en células endoteliales, estromales, neuronales y fibroblastos. La detección de determinados componentes virales por los receptores TLR se produce en la superficie celular y en el compartimento endosómico. En la superficie, TLR2 o TLR4 reconocen virus con genoma ADN o ARN mientras que en el compartimento endosomal, TLR7, TLR3 o TLR9 detectan moléculas de ARN monocatenario, ARN bicatenario o secuencias de ADN, respectivamente. Dentro de los receptores RLR se ha demostrado que RIG-I y MDA5 (proteína codificada por el gen asociado con la diferenciación del melanoma 5) funcionan como sensores de ARN viral citosólico. Por otra parte, se ha descrito que NALP3, un miembro de la familia de receptores NLR, está involu-

crado en la detección tanto de virus ADN como ARN. NALP3, ASC y pro-caspasa 1 forman un complejo molecular citosólico multimérico, conocido como inflamasoma NALP3, que controla el procesamiento de la pro-interleuquina 1 (pro-IL-1) y la pro-interleuquina 18 (pro-IL-18) en sus formas activas: IL-1 e IL-18, respectivamente (14).

La mayoría de los estudios realizados sobre el proceso de reconocimiento de los poxvirus por parte de la célula hospedadora se habían llevado a cabo con cepas competentes en replicación que codifican inmunomoduladores que actúan de forma coordinada y a diferentes niveles para contrarrestar la respuesta antiviral inducida por la célula. Debido a este hecho, nos pareció muy interesante y novedoso averiguar cómo ocurría este proceso con cepas atenuadas de VACV.

En colaboración con el grupo del Dr. Thierry Calandra nos propusimos identificar las bases moleculares del reconocimiento innato de las cepas atenuadas MVA y NYVAC, así como evaluar de forma comparativa el perfil inflamatorio que inducían ambos vectores al infectar macrófagos de origen humano y murino. El estudio mostró que la infección de macrófagos humanos por MVA induce altos niveles de IFN- β , quimioquinas (IL-8, MIP-1 α , MIP-1, MCP-1, RANTES e IP-10) e IL-1ra, mientras que los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 p40) fueron menores. Por su parte, la infección por NYVAC indujo la secreción de niveles bajos de IL-8, IL-1 β e IFN- β y no se hallaron niveles detectables de TNF, IL-6, MIP-1 α , RANTES o IP-10. El análisis de la producción de quimioquinas inde-

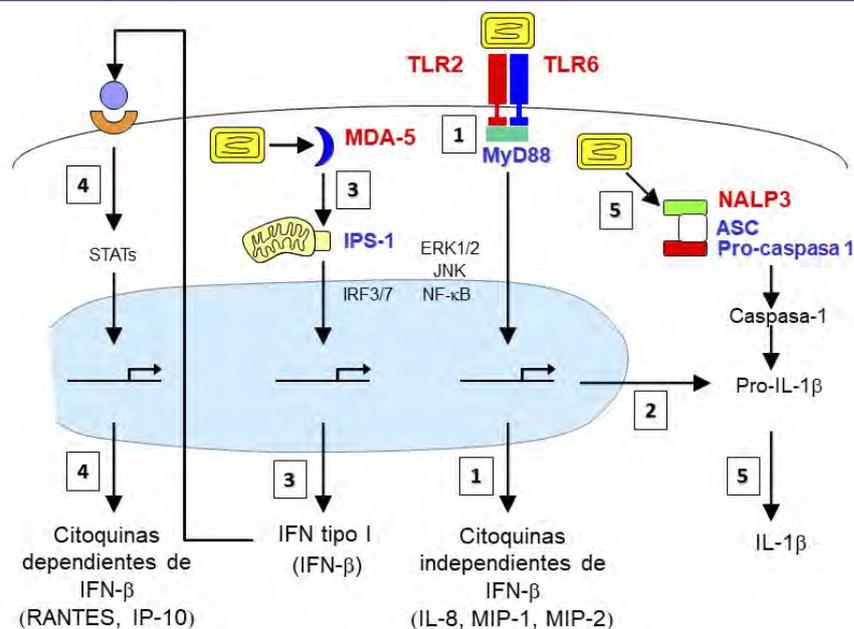


Figura 6. Rutas activadas por MVA en macrófagos. En la superficie celular, el heterodímero TLR2-TLR6 detecta al virus MVA e induce por un lado la producción de quimioquinas independientes de IFN β (IL-8, MIP-1 y MIP-2) (1) y por otro la producción de pro-IL-1 β (2). Tras la entrada del virus en la célula, los componentes virales citosólicos (posiblemente ARNm tempranos o ADN viral) activan la vía MDA-5-IPS-1 para liberar IFN- β (3) y la inducción posterior de quimioquinas dependientes de IFN- β (tales como RANTES e IP-10) después de la activación del receptor de IFN tipo I (4). Finalmente, la infección por MVA conduce a la activación del inflamasoma NALP3 (compuesto por NALP3, ASC y pro-caspasa 1) que permite el procesamiento de la caspasa-1, la maduración de la pro-IL-1 β y la secreción de IL-1 β (5). La partícula viral de MVA aparece indicada en amarillo.



pendientes de IFN- β en macrófagos aislados de ratones deficientes en receptores TLRs o en las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF revelaron un papel fundamental del complejo heterodimérico TLR2-TLR6 y de la proteína adaptadora MyD88 en la detección tanto de MVA como de NYVAC. Del mismo modo, solo MDA5 e IPS-1 estuvieron involucrados en la detección intracelular de ambas cepas y en la producción de IFN- β y de las quimioquinas dependientes de IFN- β en macrófagos. Tanto en MVA como en NYVAC la interacción entre TLR2-MyD88 y el inflamasoma NALP3 fue esencial para la expresión y el procesamiento de la pro-IL-1 β en IL-1 β madura.

La detección de MVA por los diferentes receptores de reconocimiento de patrones descritos (TLR2-TLR6-MyD88, MDA5-IPS-1 y el inflamasoma NALP3) activó de forma eficiente múltiples vías de señalización intracelular, incluyendo NF κ B, ERK-1/2, JNK, IRF3, IRF7 y STAT-1, mientras que la detección de NYVAC indujo una activación muy débil de dichas rutas (Figura 6).

Este trabajo, publicado en la revista "PLoS Pathogens" (15), además de definir los componentes moleculares involucrados en el reconocimiento de las cepas atenuadas MVA y NYVAC, demostró por primera vez la implicación directa de MDA-5 en la detección innata de un virus ADN y la interacción entre las vías TLR y NLR en el contexto de una infección viral.

2.4. Distribución in vivo

Los poxvirus, y en particular el VACV, pueden diseminarse dentro del hospedador mediante: (i) propagación directa de célula a célula utilizando colas de actina; (ii) como virus libre; (iii) leucocitos infectados; y/o (iv) motilidad celular inducida por virus. Se cree que los EVs son particularmente importantes para una rápida diseminación célula a célula in vivo, mientras que los MVs probablemente contribuyan a la propagación a distancia del virus tras la muerte celular o ruptura de la membrana (16).

En contraste con las cepas del VACV competentes en replicación, los virus atenuados MVA y NYVAC no producen progenie viral en la mayoría de las células de mamíferos; sin embargo, como definimos anteriormente, poseen un comportamiento diferencial in vitro que afecta tanto a procesos de replicación y morfogénesis viral como al perfil inflamatorio que desencadenan en la célula hospedadora.

Con estos antecedentes, era importante caracterizar la diseminación in vivo de ambos virus y analizar la cinética de expresión de genes heterólogos codificados por recombinantes basados en ellos en diferentes tejidos. Para abordar este objetivo generamos vectores recombinantes basados en MVA o NYVAC que expresan como marcador reportero la proteína luciferasa. Los virus recombinantes obtenidos fueron inoculados en ratones BALB/c empleando diferentes rutas sistémicas o de mucosas y su capacidad de diseminación fue evaluada mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI, "Bioluminescence Imaging"). Esta técnica ofrece la posibilidad de estudiar procesos biológicos

en organismos vivos y se basa en la detección de luz visible emitida tras la descarboxilación oxidativa de la luciferina, una reacción que es catalizada por la enzima luciferasa en presencia de ATP y oxígeno (17). Además de monitorizar la expresión de un determinado gen, esta tecnología nos permite cuantificar en un mismo animal la progresión de la infección viral en el espacio y en el tiempo, identificando las variaciones en replicación y diseminación del virus. De hecho, dada la gran utilidad que ha tenido en el campo de la poxvirología, hemos escrito un capítulo dedicado a ella en el libro "Vaccinia Virus. Methods and Protocols" por invitación de su editor, el Dr. Jason Mercer (18).

Este estudio, publicado en la revista "Journal of General Virology", con mi contribución como primera autora (19), demostró que existen diferencias en el comportamiento in vivo entre las cepas MVA y NYVAC que afectan tanto a los niveles de expresión del gen heterólogo como a su permanencia dentro del animal. En la mayoría de las rutas analizadas la expresión del gen reportero es transitoria, limitándose a las 24 horas post-inoculación en el caso de los animales inmunizados con el recombinante basado en MVA y permaneciendo hasta las 72 horas post-inoculación en el recombinante basado en NYVAC. En ninguno de los órganos analizados (cavidad peritoneal, bazo, nódulos linfáticos y ovarios) se detectaron partículas infecciosas, confirmando la capacidad de replicación restringida de ambos vectores y avalando su perfil de seguridad. Las rutas de administración sistémicas, en particular la ruta intraperitoneal (i.p.) y la intramuscular (i.m.), resultaron más efectivas que las rutas de mucosas. Ambos virus tienen la capacidad de alcanzar e infectar tejidos diana distintos a los del sitio de inoculación; sin embargo, los resultados obtenidos al evaluar la cinética de expresión de luciferasa mediante ensayos bioquímicos indicaron que la eficiencia de expresión génica de MVA es mayor que la de NYVAC a tiempos tempranos post-infección, lo que podría estar relacionado con la susceptibilidad de determinados tipos celulares a la infección por ambas cepas (Figura 7).

Para extender estos resultados a otro modelo animal realizamos un estudio, como parte de un equipo multidisciplinario liderado por el Dr. Max Corbett, que evaluó la distribución, seguridad e inmunogenicidad de virus recombinantes basados en MVA y NYVAC cuando se administran mediante aerosoles a primates no humanos. Esta ruta de inoculación ofrece ventajas potenciales de seguridad, logística y ahorro de costes sobre las rutas tradicionales de vacunación y representa una alternativa en el contexto de patógenos transmitidos por ruta de mucosas.

Los resultados obtenidos demostraron la viabilidad y el potencial del uso del aerosol para administrar las cepas atenuadas MVA y NYVAC. Las imágenes de gammagrafía in vivo realizadas a tiempo real en las regiones de la cabeza y el tórax de los animales que inhalaban los vectores radiomarcados revelaron que tanto MVA como NYVAC se depositan de forma eficiente en varias regiones de la mucosa, incluyendo los pulmones, los senos paranasales, la boca, la región oro-

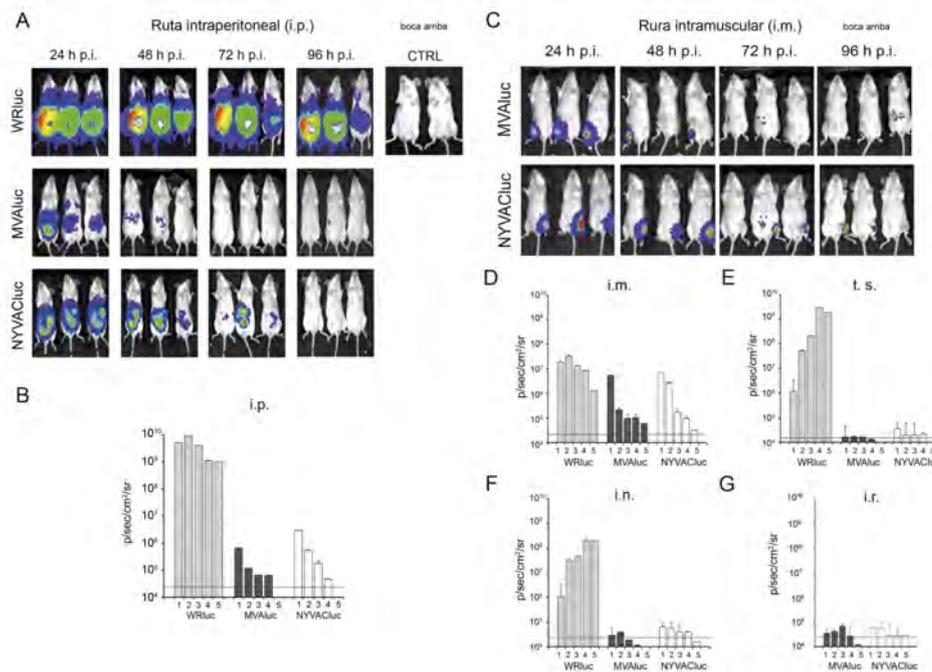


Figura 7: Distribución de los virus WRLuc, MVALuc y NYVACluc en ratones inmunizados por diferentes rutas. A: Localización de la señal de luciferasa en ratones inoculados por ruta intraperitoneal (i.p.) a distintos tiempos post-infección. En la esquina superior derecha se muestra la señal procedente de los ratones inoculados con PBS. B: Cuantificación de la emisión de fotones a lo largo del tiempo en la región de interés (RI) tras la inoculación por ruta intraperitoneal. C: Localización de la señal de luciferasa en ratones inoculados por ruta intramuscular (i.m.) a distintos tiempos post-infección. D: Cuantificación de la emisión de fotones a lo largo del tiempo en RI tras la inoculación por ruta intramuscular. E: Cuantificación de la emisión de fotones a lo largo del tiempo en RI tras la inoculación por escarificación en la base de la cola (t.s.). F: Cuantificación de la emisión de fotones a lo largo del tiempo en RI tras la inoculación por ruta intranasal (i.n.). G: Cuantificación de la emisión de fotones a lo largo del tiempo en RI tras la inoculación por ruta intrarectal (i.r.). En las gráficas se representan los valores obtenidos a lo largo del tiempo (días) junto con la desviación estándar. La línea horizontal representa el nivel basal de luminiscencia.

faríngea, el estómago y el duodeno superior. De forma intermitente se detectaron acumulaciones en el esófago y la tráquea, pero en ningún caso se detectó radiactividad en cerebro u ojos. A pesar de que la cantidad total de deposición en la superficie de mucosas fue equivalente para los dos vectores, se observaron diferencias regionales, siendo mayor la deposición de MVA en el tracto respiratorio y la de NYVAC en el tracto gastrointestinal superior. Los animales permanecieron sanos durante todo el período de experimentación y no presentaron ninguna patología cerebral ni cambios histológicos en las regiones de deposición de los vectores asociados a la vacunación, acreditando el perfil de seguridad de ambas cepas atenuadas en primates. A pesar de la baja dosis de vacuna administrada, la absorción eficiente de los antígenos virales por parte de las células que conforman los tejidos de las mucosas garantizó la generación de respuestas inmunes específicas, tanto celulares como humorales, que fueron detectables hasta 5 meses después de la inmunización. Este estudio, publicado en la revista "PNAS" (20), fue el primero que exploró y demostró el perfil de seguridad e inmunogenicidad de los vectores basados en las cepas atenuadas MVA y NYVAC cuando se administran mediante aerosol.

En conjunto, todos estos resultados *in vivo* confirmaron que tanto las rutas sistémicas como las de mucosas son seguras y efectivas para la administración de recombinantes basados en las cepas atenuadas MVA y NYVAC.

nuadas MVA y NYVAC.

2.5. Inmunogenicidad de recombinantes basados en MVA y NYVAC que expresan antígenos del VIH

Los resultados descritos hasta el momento demuestran que ambas cepas atenuadas poseen un comportamiento diferencial tanto *in vitro* como *in vivo*. Para definir si estas diferencias condicionaban la capacidad inmunogénica de ambos vectores, decidimos llevar a cabo un estudio comparativo entre virus recombinantes basados en MVA o NYVAC que expresaban antígenos del VIH.

En este sentido, nuestro laboratorio fue seleccionado para participar en un proyecto cooperativo y multidisciplinario denominado "EuroVacc" (de las siglas en inglés "European Vaccine Effort Against HIV/AIDS"), financiado por la comisión europea de control de enfermedades infecciosas, y cuyo objetivo principal era el desarrollo de candidatos vacunales frente al VIH/SIDA explorando diferentes plataformas. Nuestra aportación se centraba en la generación y caracterización de virus recombinantes basados en la cepa atenuada MVA, así como en la evaluación de su inmunogenicidad en protocolos homólogos o heterólogos que incluían otros vectores desarrollados dentro del consorcio. Todos los vectores producidos dentro del marco del proyecto expresaban los antígenos Env, Gag, Pol y Nef del VIH-1 que in-



cluyen los principales determinantes antigénicos reconocidos durante la infección viral. Los genes sintéticos que codificaban dichos antígenos fueron diseñados y optimizados para eliminar regiones antigénicas no deseadas que pudieran comprometer la seguridad del vector, así como para mejorar su expresión en células humanas. Teniendo en cuenta la diversidad del VIH-1, se propuso que los genes a incluir procedieran de aislados virales de los subtipos B y C. El subtipo B del VIH-1 es predominante en América, Europa occidental, Australia y Japón, y aunque representa solo el 12 % de las infecciones a nivel mundial, es el más utilizado en el desarrollo de prototipos de vacunas. El subtipo C, sin embargo, es el más abundante a nivel global, representando más del 50 % de las infecciones, y predomina especialmente en el África subsahariana, India, China y Nepal (21).

El primer virus recombinante que generamos en el laboratorio fue el denominado MVA-B. Este virus tiene insertado dentro del mismo locus viral (TK, timidina quinasa) los genes que codifican la proteína de la envuelta gp120, procedente del aislado primario BX08, y la poliproteína de fusión Gag-Pol-Nef (GPN), procedente del aislado IIB, ambos pertenecientes al subtipo B. Los genes env y gpn se encuentran en posición opuesta bajo el control transcripcional del promotor viral sintético temprano-tardío pE/L. Esta misma aproximación se empleó para la generación del virus recombinante MVA-C, que expresa los mismos antígenos del VIH-1 pero procedentes del aislado

asiático 97CN54 perteneciente al subtipo C. Por razones de seguridad y teniendo en cuenta su posible aplicación clínica, ambos recombinantes se generaron utilizando un plásmido de transferencia, diseñado por nosotros, que contiene un gen marcador de selección flanqueado por 2 repeticiones de la región izquierda del locus TK, de manera que tras los primeros pases de purificación este gen marcador se pierde mediante un proceso de recombinación homóloga entre ambas repeticiones. Los virus recombinantes MVA-B y MVA-C son equivalentes a los generados por la empresa Sanofi-Aventis sobre la cepa parental NYVAC y que han sido referidos en los trabajos publicados como NYVAC-B y NYVAC-C. Tanto los vectores del subtipo B (MVA-B y NYVAC-B) como los del subtipo C (MVA-C y NYVAC-C) expresan la proteína gp120 monomérica como un producto que se libera al sobrenadante y GPN como una poliproteína de fusión intracelular. Cuando se caracterizaron en células en cultivo observamos que todos ellos (i) habían incorporado en su genoma los genes heterólogos sin ninguna modificación genética y no presentaban contaminación con la cepa parental; (ii) presentaban cinéticas de expresión de los antígenos heterólogos similares; (iii) eran capaces de replicar eficientemente en cultivos primarios de CEF, obteniéndose altos rendimientos virales; y (iv) eran muy estables, conservando la integridad del inserto tras someterse a pases sucesivos en cultivos celulares. En la Figura 8 se muestra un ejemplo representativo de la caracterización in vitro de los virus recombinantes del subtipo B.

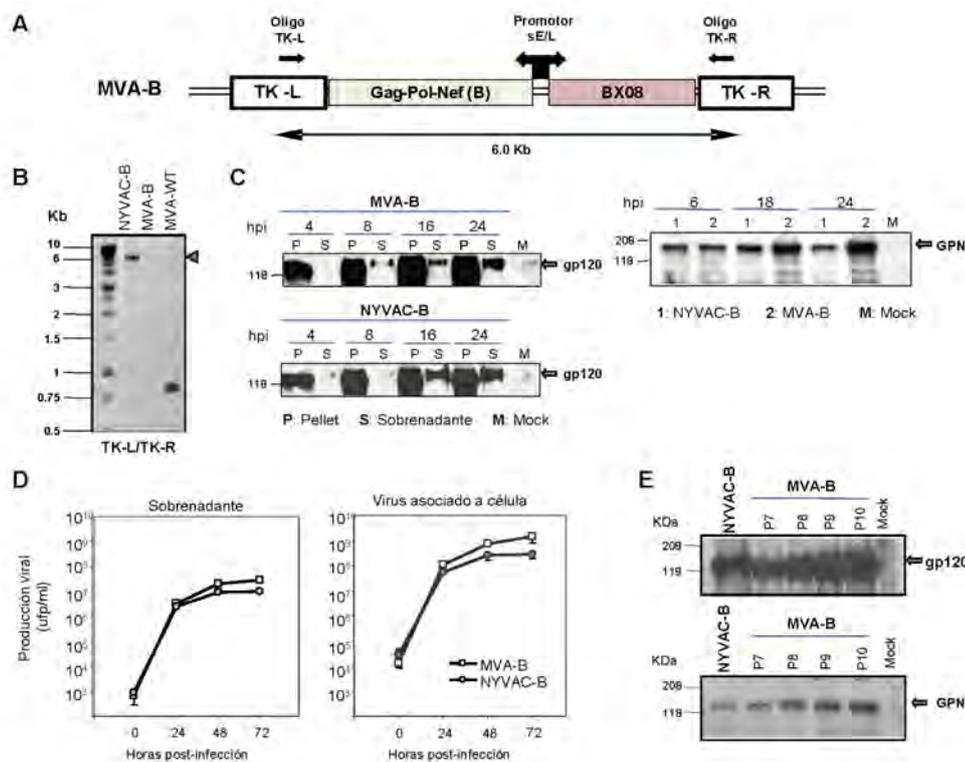


Figura 8: Caracterización in vitro de MVA-B y NYVAC-B. A: Representación esquemática del locus TK de los virus recombinantes MVA-B y NYVAC-B donde se encuentran insertados los genes que codifican para las proteínas gp120BX08 y GPN del VIH-1 bajo el control transcripcional del promotor viral sintético temprano-tardío (sE/L). B: Análisis por PCR del locus viral TK. C: Cinética de expresión de las proteínas gp120BX08 y GPN en células infectadas con MVA-B o NYVAC-B analizada por western-blot. D: Cinética de crecimiento de los virus MVA-B y NYVAC-B en cultivos primarios de CEF. La gráfica de la izquierda representa el virus liberado al sobrenadante y la de la derecha el virus que permanece asociado a las células. E: Expresión de las proteínas gp120BX08 y GPN tras pases sucesivos de MVA-B en cultivos primarios de CEF.

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29-60



Cabe destacar que la inserción de los antígenos del VIH-1 en el genoma viral no modifica las características intrínsecas de sus respectivos vectores parentales, como la inducción de apoptosis o la inhibición de la síntesis de proteínas a tiempos tardíos descritas para la cepa NYVAC.

A pesar de que los poxvirus han demostrado ser unos excelentes inmunógenos, la experiencia obtenida tanto en los ensayos preclínicos como en los ensayos clínicos indica que su utilización en sistemas combinados de inmunización, preferentemente en la dosis de refuerzo, representa la vía más efectiva para lograr una potenciación de la respuesta inmune específica (22). En este sentido, nuestro laboratorio ha sido pionero en el desarrollo y optimización del protocolo de inmunización denominado "prime-boost" (inmunización-refuerzo) empleando vectores basados en poxvirus en el "boost". Dicho protocolo ha logrado inducir respuestas inmunes celulares que correlacionaron con protección en el modelo de malaria (23).

Para evaluar de forma comparativa la inmunogenicidad inducida por los vectores generados utilizamos diferentes protocolos de inmunización, tanto homólogos como heterólogos, utilizando como "prime" vectores de ADN o recombinantes basados en el virus del bosque Semliki (SFV), seguido de un "boost" con los vectores basados en MVA o NYVAC, todos expresando los mismos antígenos. Empleamos dos modelos de ratón, la cepa BALB/c y los ratones transgénicos humanizados HHD, que solamente disponen de la quimera humana HLA-A2.1 como molécula de histocompatibilidad de clase I. De modo general, observamos que tanto los vectores basados en MVA (MVA-B y MVA-C) como los basados en NYVAC (NYVAC-B y NYVAC-C) eran capaces de inducir una potente respuesta inmune celular específica frente a los antígenos Env, Gag, Pol y Nef del VIH-1, detectada por la técnica de ELISPOT, tanto en ratones BALB/c como en ratones humanizados HHD. Sin embargo, detectamos diferencias en la magnitud y la amplitud de la respuesta generada que dependían del protocolo de inmunización empleado en cada modelo. En protocolos de inmunización homólogos, los recombinantes basados en MVA estimularon una respuesta celular VIH-1-específica superior a la inducida por los recombinantes basados en NYVAC, mientras que la respuesta específica frente al vector presentaba un comportamiento contrario (NYVAC > MVA).

Las combinaciones heterólogas (ADN/Pox o SFV/Pox) demostraron ser más inmunogénicas que el protocolo homólogo (Pox/Pox). En ratones BALB/c, los recombinantes basados en NYVAC expandieron de forma más efectiva los clones de células T específicos frente al VIH-1 que habían sido inicialmente estimulados por los vectores de ADN o SFV administrados en el "prime", obteniéndose una magnitud de la respuesta de células T superior a la inducida por los recombinantes basados en MVA. En este modelo animal, la respuesta celular específica se distribuyó de forma equitativa entre los 4 antígenos del VIH-1 expresados por los diferentes candidatos vacunales. Sin embargo, en ratones transgénicos HHD la magnitud de la respuesta ce-

lular VIH-1-específica inducida por ambos vectores fue similar y estuvo dirigida esencialmente frente a los grupos de péptidos representativos del antígeno de la envuelta (Env). El patrón de citoquinas detectado en los sobrenadantes de los cultivos celulares de linfocitos del bazo tras la reestimulación con las diferentes mezclas de péptidos del VIH-1 demostró una clara polarización de la respuesta celular hacia un fenotipo Th1, independientemente del protocolo o del modelo animal empleado. Además de la respuesta celular inducida, tanto los recombinantes basados en MVA como los basados en NYVAC estimularon la producción de anticuerpos de unión específicos frente al antígeno de la envuelta del VIH-1.

Estos resultados fueron los primeros que describieron comparativamente el potencial inmunogénico de los vectores basados en MVA y NYVAC in vivo. El trabajo fue publicado en dos artículos originales, con mi contribución como primera autora, en la revista "Vaccine" (24, 25).

A pesar de que en ambas cepas de ratones obtuvimos resultados prometedores, el modelo murino no permitía evaluar la eficacia de estos recombinantes a la hora de conferir protección frente a la infección por el VIH. Debido a esto, y en colaboración con el grupo del Dr. Jonathan Heeney en el marco del proyecto EuroVacc, decidimos realizar un estudio en primates no humanos para evaluar la inmunogenicidad de los recombinantes basados en MVA y NYVAC, así como determinar su capacidad para conferir protección frente a un desafío intravenoso con la cepa altamente patogénica SHIV89.6p, un virus híbrido entre el VIH-1 y el virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) denominado SHIV (del inglés "Simian-Human Immunodeficiency Virus") capaz no solo de infectar macacos sino de producir un síndrome similar al SIDA. Este virus híbrido contiene los genes env, tat, vpu y rev del aislado primario 89.6 del VIH-1 y los genes restantes del VISmac239 (26) y, a través de pases sucesivos en macacos y en cultivo, se ha adaptado a multiplicarse y provocar la depleción de los linfocitos CD4 y la muerte de los macacos en menos de un año después de la inoculación.

Para poder llevar a cabo el estudio generamos recombinantes basados en MVA y NYVAC, equivalentes a MVA-B y NYVAC-B, pero que expresan la proteína monomérica gp120 del virus SHIV89.6p y la poliproteína de fusión GPN procedente del virus VISmac239. Ambos vectores fueron caracterizados in vitro, confirmándose un comportamiento similar al observado con los recombinantes que expresan los antígenos del VIH-1 de los subtipos B y C. Una vez generados dichos recombinantes, los macacos fueron inmunizados utilizando el protocolo heterólogo ADN/Pox. Este estudio reveló que tanto el recombinante basado en MVA como el basado en NYVAC eran capaces de conferir una protección similar frente a la infección con el virus altamente patogénico SHIV89.6p (Figura 9A). Tras el desafío, todos los animales resultaron infectados; sin embargo, los animales inmunizados con los recombinantes MVA y NYVAC mantuvieron niveles estables de células T CD4 durante un periodo de tiempo superior a un año y fueron capa-

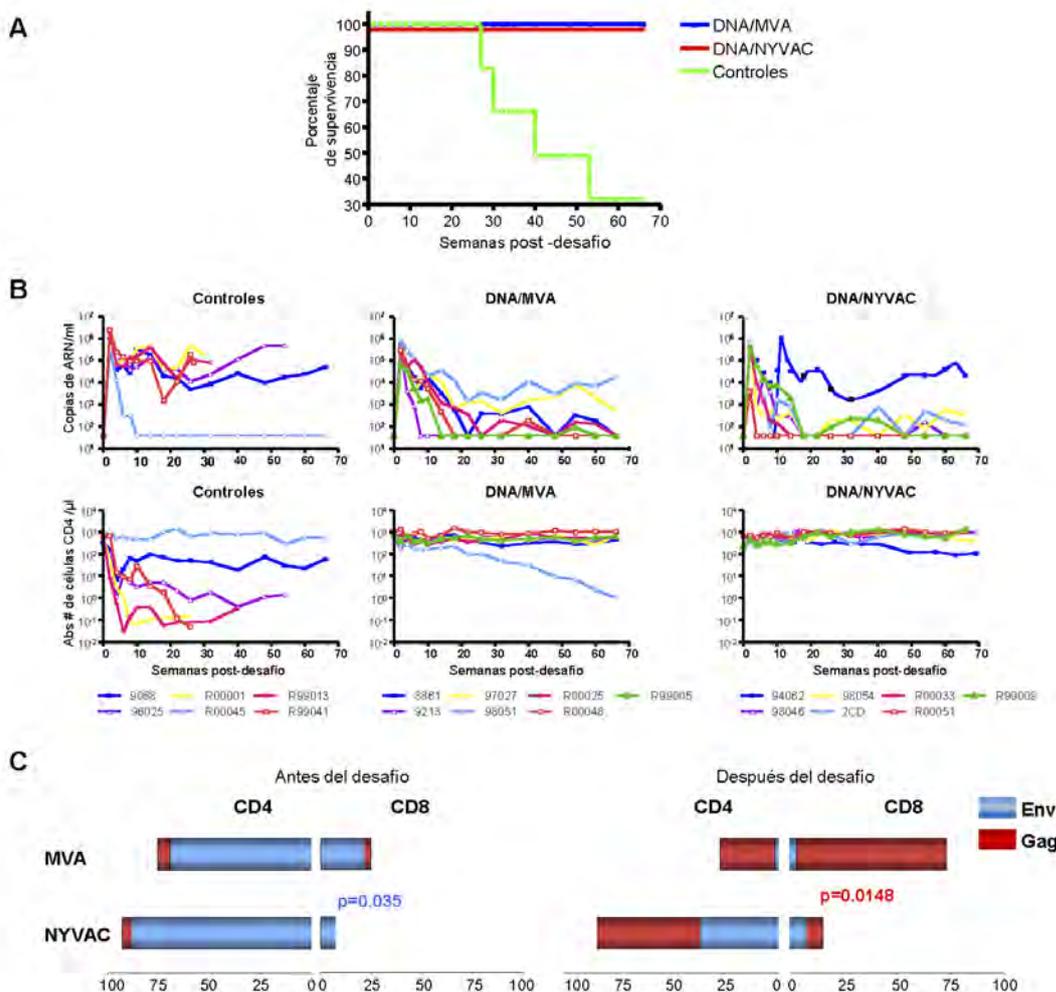


Figura 9: Eficacia de los recombinantes basados en MVA y NYVAC frente a la infección por el virus híbrido SHIV89.6P en primates no humanos. A: Porcentaje de supervivencia después del desafío. B: Niveles de carga viral (arriba) y número absoluto de células T CD4 (abajo) en los animales individuales de cada grupo de inmunización. C: Contribución de las poblaciones de células T CD4+ y T CD8+ en la respuesta específica frente al VIH-1 antes del desafío (izquierda) y después del desafío (derecha).

ces de controlar la viremia, manteniendo la carga viral o disminuyéndola hasta 2 logaritmos por debajo de la detectada en los animales del grupo control durante todo el periodo de análisis (Figura 9B). La protección observada se correlacionó con la inducción de una respuesta de células T específicas frente a los diferentes antígenos ya que los niveles de anticuerpos neutralizantes antes del desafío fueron insuficientes para prevenir la infección de los animales inmunizados. En ambos grupos, la respuesta de células T específica inducida antes del desafío estaba dirigida fundamentalmente frente al antígeno de la envuelta, como ocurría en los ratones transgénicos HHD, mientras que después del desafío se dirigió mayoritariamente frente a los antígenos Gag-Pol-Nef. A pesar de que mediante la técnica de ELISPOT no se observaron diferencias en la magnitud de la respuesta de células T específicas entre ambos vectores, el análisis por citometría de flujo reveló que la respuesta celular específica inducida por MVA estaba mediada por linfocitos T CD8+, mientras que la inducida por NYVAC estaba mediada por linfocitos T CD4+ (Figura 9C). Esta activación di-

ferencial de células T CD4 o CD8 por parte de los vectores se mantuvo tras el desafío y durante todo el período que duró el experimento. Ambos subtipos de células T activadas presentaban un fenotipo poli-funcional y capacidad proliferativa.

Estos resultados demostraron por primera vez que recombinantes basados en MVA y NYVAC eran capaces de conferir una protección similar frente a la infección por SHIV en primates no humanos a través de la potenciación de respuestas celulares diferentes: en el caso de MVA mediada por células T CD8+ y en el caso de NYVAC mediada por células T CD4+. Este estudio, publicado en la revista "J. Virol." (27), permitió la traslación de los vectores basados en las cepas atenuadas MVA y NYVAC generados en el marco del proyecto EuroVacc de la evaluación preclínica a la fase clínica.

Los vectores MVA-B y MVA-C fueron objeto de la patente europea "Vectores recombinantes basados en el virus modificado de Ankara (MVA) como vacunas preventivas y terapéuticas contra el SIDA" (EP1921146B1), cuya entidad titular de derechos es el Consejo Superior

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.



de Investigaciones Científicas (CSIC), y que fue transferida a la compañía farmacéutica Laboratorios Esteve S.A.

2.6. Optimización de vectores recombinantes basados en MVA y NYVAC

La capacidad restringida de replicación de las cepas atenuadas MVA y NYVAC en diferentes líneas celulares de mamífero y en células humanas sin duda confiere a estos vectores un perfil de seguridad óptimo para su utilización en clínica, pero también representa una limitación si consideramos que la cantidad de antígeno que se expresa está limitada al tiempo que permanece el virus en el organismo (48-72 h). Sin embargo, a pesar de esta limitación, ambos vectores han demostrado ser inmunogénicos en los diferentes modelos animales ensayados, debido, en gran medida, a la respuesta inflamatoria que inducen en las células infectadas y que, a su vez, está correlacionada con las deleciones en genes inmunomoduladores que han sufrido ambos genomas virales durante su generación.

Como parte de un consorcio internacional financiado por la Fundación Bill & Melinda Gates con el fin de desarrollar una vacuna contra el VIH/SIDA basado en la optimización de los vectores de poxvirus MVA y NYVAC, nuestro grupo se dedicó a explorar nuevas estrategias que permitieran mejorar el perfil inmunogénico de ambas cepas. Para lograr este propósito nos planteamos abordar diferentes aproximaciones que incluían: (i) eliminar genes inmunomoduladores virales todavía presentes en el genoma viral; (ii) mejorar la capacidad replicativa del vector; (iii) utilizar moléculas coestimuladoras; (iv) mejorar la fortaleza del promotor viral; y (v) optimizar los insertos. Las diferentes estrategias se ensayaron sobre los recombinantes de MVA y NYVAC que expresan los antígenos del VIH-1 de los subtipos B y C, administrados utilizando el protocolo heterólogo ADN/Pox.

2.6.a. Deleción selectiva de genes inmunomoduladores

Como mencionamos con anterioridad, las cepas atenuadas MVA y NYVAC exhibían comportamientos distintos tanto in vitro como in vivo debido a las diferencias que existen en sus genomas como resultado del proceso de generación al que fueron sometidas. La infección con la cepa MVA induce un perfil inflamatorio mucho más agudo que NYVAC, lo que garantiza el reclutamiento de mediadores inmunológicos que son capaces de activar una respuesta innata efectiva que clarifica de forma eficiente el virus poco después de su entrada en el organismo. Esta activación se produce debido a la cantidad de genes inmunomoduladores que aparecen delecionados o mutados en su genoma, que son mayores que los que se encuentran delecionados en la cepa NYVAC, y que actúan en rutas de señalización claves en la evasión de la respuesta antiviral. Sin embargo, ambos virus conservan intactos muchos otros genes con funciones similares. Con estos antecedentes, decidimos llevar a cabo deleciones selectivas de genes que estuvieran implicados en una misma ruta de señalización, o incluso en rutas di-

ferentes. El hecho de que NYVAC conserve un número mayor de genes relacionados con la evasión de la respuesta antiviral nos permitía un margen más amplio de experimentación para evaluar el efecto sobre la respuesta inmune específica de una deleción individual o de múltiples combinaciones.

De forma general, la estrategia de deleción selectiva de genes inmunomoduladores produjo un aumento de la inmunogenicidad inducida por los vectores generados. Por ejemplo, la deleción de los genes *B19R* y/o *B8R* que codifican receptores solubles de IFN tipo I y tipo II, respectivamente, mejoró la magnitud y la calidad de la respuesta de células T CD8 específicas frente al VIH-1 durante las fases adaptativa y de memoria en el modelo murino (28). Asimismo, el análisis transcriptómico realizado en monocitos humanos infectados con estos mutantes demostró que ambas deleciones activan la expresión de los factores IRF3, IRF7 y STAT1 y estimulan la producción de altos niveles de IFN tipo I y de genes estimulados por IFNs (ISGs); sin embargo, solo la doble deleción *B8R/B19R* logró inducir la máxima respuesta inflamatoria (29). La combinación de deleciones en genes relacionados con la ruta de señalización del IFN (*B19R*, *B8R*) junto con regiones genómicas (*B6R-B10R*) que incluyen genes que codifican el receptor soluble de TNF- α (*B7*) o proteínas con funciones desconocidas (*B6*, *B9* y *B10*) no logró mejorar la inmunogenicidad inducida por el doble mutante de deleción Δ *B19R/B8R* (30). Un efecto similar se observó cuando delecionamos genes que bloquean la ruta de activación del factor de transcripción NF κ B a diferentes niveles. La deleción individual del gen *A46R*, que actúa a un nivel superior en la ruta de señalización de los TLRs interfiriendo con la interacción TLR-molécula adaptadora, aumenta la secreción de las citoquinas TNF, IL-6 e IL-8 en macrófagos humanos in vitro y mejora la magnitud de la respuesta inmune de las células T CD4 y CD8 específicas del VIH-1 in vivo (31); sin embargo, cuando realizamos deleciones secuenciales sobre este mutante de otros genes virales siguiendo el nivel en el que actúan bloqueando la ruta de activación de NF κ B (*A52R-K7R-B15*), observamos que solo la doble deleción Δ *A46R/A52R* logró inducir un beneficio inmunológico con respecto al mutante simple (30). Curiosamente, cuando abordamos la estrategia de deleción de esta ruta manteniendo intacto el gen *A46R* pero delecionando *A52R-K7R-B15R*, descubrimos que solo la deleción triple era capaz de restaurar la función de NF κ B en macrófagos. De este modo, la infección con NYVAC-C Δ 3 activa la vía de señalización de NF κ B produciendo un aumento en la expresión de citoquinas/quimioquinas (IL-6, MCP-1, MIP-1 β , KC) que incrementa la migración de neutrófilos (N α y N β) al sitio de inoculación y su activación. Una vez activados, la infección con NYVAC-C Δ 3 promueve una mayor migración de neutrófilos, preferentemente de los neutrófilos N β , a los órganos linfoides secundarios. Estos neutrófilos N β sobreexpresan en su superficie marcadores específicos de células presentadoras de antígeno que les permiten activar a las células T CD8 específicas de forma directa (Figura 10).

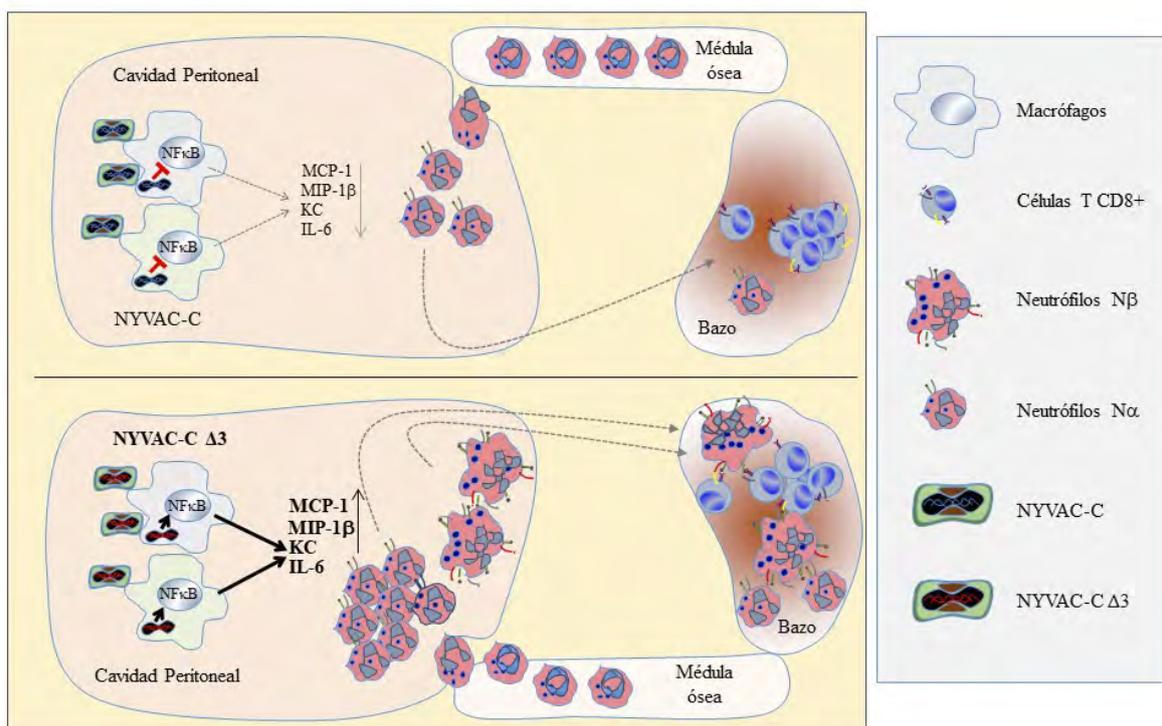


Figura 10: Mecanismo de activación de neutrófilos y su implicación en la activación de células T CD8+ tras la infección por NYVAC-C o NYVAC-C Δ3.

El aumento en el tráfico de neutrófilos al sitio de infección correlacionó con una mayor respuesta de células T específicas frente al VIH-1. Estos resultados, publicados en la revista "PNAS", identificaron por primera vez a los neutrófilos como un mediador celular involucrado en la respuesta inmune inducida por VACV, un aspecto novedoso que sin duda resulta de gran importancia de cara a la utilización de estos vectores como candidatos vacunales (32).

La delección selectiva de genes inmunomoduladores todavía presentes en el genoma de MVA también demostró tener un beneficio inmunológico. Por ejemplo, la simple delección de genes que codifican inhibidores de la vía de señalización de IFN tipo I (*C6L*) (33), apoptosis (*FIL*) (34), proteína de unión a IL-18 (*C12L*) (35) o un inhibidor de IRF-3 (*N2L*) (36), indujo un aumento en la magnitud, polifuncionalidad y durabilidad de las células T CD4 y CD8 específicas frente al VIH-1. Estos resultados se potenciaron aún más con los dobles mutantes de delección $\Delta A41L/B16R$ (37) o $\Delta C6L/K7R$ (38).

Los datos de inmunogenicidad derivados de la delección del gen *C6L* en el genoma de MVA formaron parte de la patente "Vectores recombinantes basados en el virus modificado de Ankara (MVA) con delecciones en el gen *C6L* como vacunas frente al VIH/SIDA y otras enfermedades" (ES2401904B1) cuya entidad titular de derechos es el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Estos estudios en su conjunto demostraron que la eliminación selectiva de genes inmunomoduladores representa una estrategia adecuada para mejorar la inmunogenicidad de recombinantes basados en las cepas MVA y

NYVAC. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un diseño racional de la misma ya que dependiendo de la combinación de delecciones que se realice podemos conseguir una modulación positiva o negativa de la respuesta inmune específica. Tal y como hemos corroborado en nuestros estudios, un mayor número de delecciones no conlleva necesariamente un aumento en la inmunogenicidad.

2.6.b. Aumento de la capacidad replicativa del vector

Esta estrategia consiste en la generación de nuevos vectores basados en poxvirus que han recuperado la capacidad de replicación en células humanas, aumentando así el tiempo y el nivel de expresión del antígeno heterólogo en el hospedador, pero sin perder el fenotipo atenuado.

Como habíamos observado con anterioridad, la reinsertión del gen de rango de hospedador *C7L* en el genoma de NYVAC confirió al virus la capacidad de replicar en células humanas y murinas, manteniendo un fenotipo atenuado in vivo. Cuando reinsertamos el gen *C7L* en el genoma del virus recombinante NYVAC-B observamos un aumento relevante en los niveles de expresión del antígeno heterólogo in vitro que correlacionó con un incremento significativo en la magnitud y amplitud de la respuesta de células T específicas frente al VIH-1 in vivo (39).

Igualmente, demostramos que la reinsertión simultánea de *C7L* y *K1L*, otro gen de rango de hospedador, en el genoma de NYVAC-C, o la combinación de las estrategias de restauración de la competen-



cia de replicación con la delección de genes inmunomoduladores (B19R), confieren al vector una serie de características biológicas in vitro entre las que podemos destacar: mayores niveles de expresión del antígeno heterólogo, competencia de replicación en queratinocitos humanos y fibroblastos dérmicos, inducción de la expresión de IFN- γ y genes inducidos por IFN y activación de genes implicados en el procesamiento y presentación de antígenos. Esto correlaciona con una mejora significativa en la presentación cruzada del antígeno por parte de las células diana infectadas a las células T CD8 específicas del VIH, así como una mayor proliferación de los clones de memoria. Además, estos vectores poseen una propagación limitada en tejidos y mantienen un fenotipo altamente atenuado in vivo (40, 41).

2.6.c. Uso de moléculas coestimuladoras

El objetivo de esta estrategia consiste en mejorar la inmunogenicidad de los vectores atenuados mediante el suministro simultáneo de una molécula estimuladora junto con el antígeno heterólogo.

En nuestro caso, esta aproximación fue abordada mediante la utilización de la forma hexamérica soluble de CD40L (sCD40L). Nuestro estudio reveló que la administración de sCD40L era necesaria tanto en el "prime" junto con el vector de ADN como en el "boost" junto con MVA-B o NYVAC-B para lograr un aumento en la magnitud y amplitud de la respuesta de células T específicas frente a los antígenos del VIH-1. La administración de sCD40L un día después de cada inmunógeno también resultó efectiva, pero no representó una mejora en comparación con la administración conjunta. Este trabajo puso de manifiesto el beneficio inmunoestimulador de la molécula sCD40L (42).

2.6.d. Mejora de la fortaleza del promotor viral

Todos los virus recombinantes descritos en este trabajo contienen los genes heterólogos insertados bajo el control transcripcional de un promotor viral sintético temprano-tardío que garantiza su expresión durante ambas fases de la transcripción. Sin embargo, es posible mejorar el promotor viral mediante el intercambio de los elementos centrales para lograr maximizar la expresión del antígeno recombinante a tiempos muy tempranos después de la infección. En este sentido, se ha descrito que la eficiencia con la que se procesa y presenta un antígeno en la superficie de las células infectadas influye en su reconocimiento y en la potenciación de la respuesta inmune específica generada (43).

A partir de las secuencias promotoras (200 nt aguas arriba del codón de inicio) de 37 genes clasificados como genes inmediatos-tempranos mediante el análisis transcriptómico de VACV, se realizó un análisis bioinformático que definió el elemento central o secuencia consenso temprana que compartían estos genes, así como la distancia existente entre este núcleo de secuencia y el codón de iniciación. Una vez definidos ambos elementos, se diseñó un nuevo promotor sintético tar-

dío-temprano optimizado al que denominamos promotor LEO ("Late Early Optimized") que, con respecto al promotor sintético tradicional, compartía el núcleo de la parte tardía, pero intercambiado de posición, seguido de la nueva secuencia consenso temprana definida y de un espaciador de 38 nucleótidos. El nuevo promotor se incorporó en un plásmido de transferencia controlando la transcripción del gen reportero GFP (proteína verde fluorescente) y su fortaleza se estudió en el contexto del recombinante basado en MVA generado (MVA-LEO-GFP). En comparación con el promotor tradicional, LEO mejoró significativamente los niveles de expresión de GFP en la primera hora después de la infección, lo que se correlacionó con una mejora en la respuesta inmune de células T CD8+ GFP-específicas (44). Un alargamiento de la región espaciadora de 38 a 160 nucleótidos (LEO160) mejoró la expresión temprana y la respuesta de células T CD8+ y CD4+ específicas de memoria frente al antígeno LACK de *Leishmania* (45).

2.6.e. Optimización del inserto

Además de las modificaciones del vector que acabamos de describir, otro enfoque que hemos explorado con el objetivo de mejorar la inmunogenicidad de los recombinantes basados en poxvirus ha sido la optimización del antígeno heterólogo. Una de las estrategias que hemos ensayado para superar el desafío que supone la diversidad global del VIH-1 ha sido la utilización de secuencias consenso o mosaicos de la envuelta (Env) en lugar de secuencias derivadas de un determinado aislado viral. Los mosaicos son pequeños conjuntos de antígenos vacunales diseñados computacionalmente, utilizando un algoritmo genético, para aumentar la presentación de los epítomos potenciales de células T (PTE) presentes en las proteínas naturales. Una vacuna de mosaico es un "cóctel" que contiene varias secuencias complementarias que combinadas proporcionan una cobertura casi óptima de los PTE que circulan en una determinada población diana.

Cuando estos antígenos se ensayaron de forma comparativa en primates no humanos utilizando el protocolo heterólogo ADN/Pox/proteína se observó que tanto los inmunógenos de consenso como los mosaicos indujeron respuestas celulares y humorales específicas y cross-reactivas significativamente mayores que las potenciadas por el inmunógeno clásico derivado de un aislado viral (46).

También ensayamos nuevos formatos de antígenos Env y GPN optimizados que diferían de los que expresan los vectores recombinantes MVA y NYVAC de los subtipos B y C, en los que la proteína Env gp120 se secreta en forma monomérica y GPN se produce como una poliproteína de fusión intracelular. Los nuevos recombinantes generados expresaban la proteína Env gp140 que se secretaba en una conformación trimérica más parecida a la conformación nativa que adopta en el virus (NYVAC-gp140) o la proteína GPN que fue optimizada para sufrir procesamiento proteolítico y liberar partículas como virus (VLP) inducidas por Gag (NYVAC-Gag-Pol-Nef). Ambos vectores estimulan respuestas innatas específicas en células humanas superiores



a su antecesor (NYVAC-C) y presentan un fenotipo atenuado tras su inoculación intracraneal en ratones BALB/c adultos inmunocomprometidos o en ratones CD1 recién nacidos. En protocolo homólogo Pox/Pox, ambos virus recombinantes indujeron respuestas de células T CD4 polifuncionales específicas frente a Env o CD8 específicas frente a Gag (47). Estos vectores también se han ensayado en combinación con vectores de ADN que expresan los mismos antígenos y con la proteína gp120 monomérica en un ensayo clínico fase 1b que involucró a 96 voluntarios sanos con bajo riesgo de infección. Los resultados, publicados recientemente, demostraron la seguridad y tolerabilidad de los vectores y revelaron que la administración conjunta de la proteína Env gp120 con los vectores de ADN o NYVAC durante el "priming" induce una respuesta temprana y potente de anticuerpos IgG de unión frente a los lazos variables V1/V2 de la proteína de la envuelta del VIH-1 sin afectar la respuesta celular inducida por los diferentes regímenes de inmunización. Los autores de dicho trabajo proponen considerar este enfoque para la inducción de anticuerpos preventivos en futuros ensayos de eficacia (48).

3. MVA-B COMO CANDIDATO VACUNAL FRENTE AL VIH-1

Las cepas atenuadas de poxvirus MVA y NYVAC representan una plataforma formidable para el desarrollo de candidatos vacunales frente a un amplio abanico de enfermedades infecciosas, parasitarias e incluso en cáncer, como ha quedado demostrado en los diferentes ensayos preclínicos y clínicos que se han llevado a cabo (49-51). Sin embargo, como hemos descrito en la primera parte de esta revisión, ambas cepas poseen características intrínsecas propias que determinan comportamientos diferenciales tanto *in vitro* como *in vivo*. Considerando que el perfil inflamatorio que induce MVA es superior al inducido por NYVAC, lo que garantiza una respuesta innata más potente que va a determinar la calidad de la respuesta adaptativa que se desarrolle contra el patógeno y teniendo en cuenta que produce una activación preferencial de células T CD8, decidimos apostar por ella para dar el salto a la clínica y evaluarla como candidato vacunal frente al VIH/SIDA.

En esta segunda parte del trabajo haremos una revisión de las estadísticas de la infección por VIH/SIDA a nivel global y en España, detallaremos los principales retos a los que nos enfrentamos a la hora de desarrollar candidatos vacunales frente al VIH/SIDA y discutiremos los principales resultados que hemos obtenido de los ensayos clínicos fase I realizados en España con el vector MVA-B, generado por nosotros, como vacuna profiláctica en pacientes sanos y como vacuna terapéutica en pacientes infectados por VIH-1.

Indudablemente la investigación clínica genera el conocimiento que permite mejorar las intervenciones futuras para incidir de forma más efectiva en problemas que afectan a la salud pública. Sin embargo, abordar proyectos de ensayos clínicos requiere de un fuerte apoyo económico y del trabajo coordinado de grupos multidisciplinares

que garanticen el bienestar y la seguridad de los voluntarios que se presentan al estudio y la solidez de los resultados que se derivan de ellos. Gracias al soporte económico de entidades públicas y privadas como la Red Española de Investigación en SIDA (RIS), el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), la Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA (FIPSE) y la Fundación Marcelino Botín se pudieron abordar en España los ensayos clínicos RISVAC02 y RISVAC03 que detallaremos más adelante. Los resultados de estos estudios han tenido gran repercusión mediática en nuestro país y, aunque solo se han realizado en fase I como estudios exploratorios de seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad en un número reducido de pacientes, han marcado las pautas y el camino a seguir en ensayos futuros.

3.1. La infección por VIH/SIDA en cifras

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), identificado hace ya casi 40 años como agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), continúa siendo letal para la humanidad, acumulando ya más de 39 millones de muertes en todo el mundo. Las estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que hoy en día un total de 37.9 millones de personas conviven con la infección a nivel mundial.

La introducción de la terapia antirretroviral (TAR) en el tratamiento de la infección por VIH ha constituido uno de los éxitos más espectaculares en medicina en el siglo pasado, transformando la infección por VIH de una sentencia de muerte a una enfermedad crónica manejable. A nivel mundial ha tenido lugar una reducción en la morbilidad y mortalidad relacionadas con el VIH y en la actualidad un total de 23.3 millones de personas tienen acceso al tratamiento, lo que representa el 62% de los infectados. Sin embargo, a pesar de estos grandes avances, alrededor de un millón de personas mueren de enfermedades relacionadas con el VIH cada año y se producen 1,7 millones de nuevas infecciones (www.unaids.org).

En España la infección por VIH mantiene su expansión a pesar de todos los esfuerzos destinados para frenarla. Según los datos del último informe sobre vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA (2017), entre 140.000 y 170.000 personas viven con VIH y se producen 3381 nuevas infecciones al año, dejando en evidencia que los proyectos en materia de prevención no están teniendo el efecto deseado en la sociedad. La mayoría de nuevos casos se producen en hombres (84,6 %) y la media de edad se sitúa en los 35 años. Además, tanto en Europa como en España, 1 de cada 5 personas infectadas desconocen que lo están. Aparte del efecto deletéreo que tiene este desconocimiento para los enfermos, su impacto sobre la salud pública es demoledor. Se ha estimado que el 20 % de infectados sin diagnosticar es responsable del 60 % de las nuevas infecciones. Por otra parte, el diagnóstico tardío de la infección conlleva el deterioro de la inmunidad del paciente encareciendo enormemente su tratamiento.

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp.29-60



El programa conjunto de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA) se ha planteado como meta para el año 2020 el objetivo 90-90-90 para controlar y erradicar el virus. Este objetivo persigue que el 90 % de las personas con VIH estén diagnosticadas, que el 90 % de las personas diagnosticadas reciban tratamiento y que el 90 % de las personas que reciban tratamiento presenten una carga viral indetectable. A finales del año 2018 las cifras globales eran 79-62-53 (79 % diagnosticados, 62 % con acceso al tratamiento y 53 % con carga viral indetectable), lo que nos hace pensar que alcanzar la meta propuesta va a resultar difícil; no obstante, es necesario seguir aunando esfuerzos para erradicar esta enfermedad.

En España, la prevención y el diagnóstico precoz son los principales 'talones de Aquiles' para alcanzar el objetivo 90-90-90 establecido por ONUSIDA. A pesar de que nuestras cifras son más esperanzadoras que las globales (82-92-88) aún queda camino por recorrer.

Conseguir este objetivo en materia de tratamiento implica una reducción en más del 80% del número de muertes y nuevas infecciones a largo plazo. Sin embargo, es necesario contemplar otras intervenciones que puedan implementarse para contrarrestar los efectos adversos asociados con una terapia antirretroviral prolongada y el elevado coste que dicha terapia representa.

En ausencia de vacunas, poner fin a la pandemia del VIH/SIDA tendrá un coste sin precedentes. En el año 2015, el coste global destinado a la atención del VIH/SIDA fue de 49 billones de dólares. En el año 2018, ONUSIDA informó que se invirtieron 21.3 billones de dólares en países en desarrollo para luchar contra el VIH/SIDA, datos que se sitúan un 21% por debajo de los 26.2 billones de dólares que se estima serán necesarios para dar "una respuesta más eficaz" en el año 2020. Sin embargo, existen estudios de modelajes matemáticos que estiman que la introducción de una vacuna parcialmente eficaz, pero con una alta cobertura, podría reducir sustancialmente el número de nuevas infecciones por VIH (52). Se plantea que la implementación de una estrategia integral que combine una vacuna parcialmente efectiva con el tratamiento como prevención junto a la profilaxis previa a la exposición podría representar una alternativa eficaz y mucho más rentable, considerando incluso un coste de \$105 por serie de 5 dosis (53).

3.2. Retos en el desarrollo de vacunas frente al VIH/SIDA

Las vacunas son consideradas una de las intervenciones de salud pública más rentables, pero el desarrollo de una vacuna eficaz contra el VIH/SIDA ha demostrado ser uno de los desafíos científicos más complejos debido a la naturaleza del virus y su interacción con el sistema inmunitario humano. Ninguna persona se ha recuperado naturalmente de una infección por el VIH, y hasta la fecha se desconocen los correlatos que indiquen qué respuestas inmunitarias se necesitan para bloquear o eliminar el virus. Además, existen otros muchos obs-

táculos que, aunque a lo largo de los años se han ido esclareciendo en cierta medida gracias a las diferentes investigaciones en el tema, continúan siendo retos que dificultan el desarrollo de una vacuna. Entre estos obstáculos podemos destacar la elevada variabilidad genética del VIH, el todavía escaso conocimiento sobre la patogénesis de la infección, la alta tasa de mutación que permite al virus evadir rápidamente la respuesta del hospedador, la infección latente que produce en células poco accesible al sistema inmune y donde crea sus reservorios naturales, la destrucción de células dianas del sistema inmune como consecuencia de la infección, el enmascaramiento de epítomos que están directamente implicados en la entrada viral y la ausencia de un modelo animal que reproduzca la infección que ocurre en los humanos.

Además de los problemas meramente científicos, el avance en el desarrollo de vacunas frente al VIH-1 también se enfrenta a problemas logísticos. Existe todavía una escasa coordinación internacional, una inversión insuficiente (cerca del 1 % del esfuerzo global), un interés marginal por parte de la industria farmacéutica cuya prioridad se centra en las terapias antirretrovirales y la percepción de que el problema del VIH/SIDA se puede resolver con las intervenciones existentes (circuncisión, microbicidas, profilaxis pre-exposición, tratamiento como prevención) sin necesidad de una vacuna.

No obstante, y a pesar de estos obstáculos, se han hecho y se siguen haciendo grandes progresos en el desarrollo de candidatos y plataformas vacunales destinados a prevenir y tratar la infección.

El único ensayo clínico en fase III que ha demostrado hasta el momento algún grado de eficacia frente a la infección por VIH-1 fue el denominado RV144, llevado a cabo en Tailandia entre los años 2003-2009 y en el que se involucraron más de 16000 voluntarios heterosexuales sanos con riesgo moderado de infección por VIH. El estudio, supervisado y financiado por el Ministerio Tailandés de Salud Pública, el Instituto estadounidense de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) y el Ejército de los Estados Unidos, evaluó la combinación de un poxvirus recombinante basado en la cepa ALVAC, denominado vCP1521, y la proteína AIDSVAX® B/E co-formulada con Alúmina utilizando la estrategia "prime-boost". El vector vCP1521 expresa los antígenos Gag-Pol del aislado LAI del VIH-1 perteneciente al subtipo B y la proteína monomérica gp120 de la forma recombinante circulante CRF01_AE unida a la región transmembrana gp41 del aislado LAI, mientras que AIDSVAX® B/E es una vacuna de subunidades de gp120 bivalente que contiene la proteína de la envuelta de la forma recombinante circulante CRF01_AE y la del aislado MN del subtipo B (54).

Los resultados de este ensayo clínico reflejaron que el protocolo de vacunación ensayado proporcionó una eficacia del 31.2 % en la prevención de la infección por VIH-1 en el transcurso de 42 meses a pesar de la ausencia de anticuerpos neutralizantes. La presencia de anticuerpos IgG no neutralizantes frente a los lazos variables V1/V2 de la proteína de la envuelta viral y de anticuerpos que median la ci-

totoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de bajos niveles de IgA en plasma correlacionaron con un menor riesgo de infección por el virus (55). Además, desde el punto de vista de la respuesta celular, se detectó la presencia de células T CD4+ efectoras y polifuncionales en individuos vacunados protegidos (56).

A pesar de que la eficacia obtenida fue modesta, este ensayo clínico puso de manifiesto el hecho de que conseguir una vacuna preventiva frente al VIH/SIDA era posible, algo que se había puesto en duda tras los fracasos registrados en anteriores ensayos de eficacia con recombinantes de adenovirus y proteína gp120, y marcó el camino en el diseño y evaluación de nuevos candidatos vacunales. Además, demostró que se dispone actualmente de las infraestructuras necesarias para desarrollar ensayos de eficacia en países con alta incidencia de la infección, y que es necesario llevar a cabo grandes mejoras en los candidatos vacunales con el fin de incrementar su grado de protección. El hecho de que una cepa altamente atenuada como ALVAC fuera uno de los componentes de este ensayo ha reforzado la utilización de los poxvirus como plataforma a incluir en ensayos futuros.

3.3. Efecto de MVA-B sobre células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son los centinelas naturales del sistema inmune, derivan de precursores hematopoyéticos y proceden principalmente de linaje mielóide. Al ser las principales células profe-

sionales presentadoras de antígeno (APCs) son importantes tanto en la estimulación/activación como en la regulación de la intensidad de la respuesta de linfocitos T y linfocitos B. La exposición de las DCs a agentes infecciosos induce cambios funcionales y de expresión génica los cuales, de manera coordinada, activan su capacidad para interactuar con los linfocitos T y promover tanto su proliferación como su diferenciación funcional.

Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que recombinantes basados en la cepa atenuada MVA infectan de forma efectiva las células presentadoras de antígeno, fundamentalmente las células mieloides MHC clase II+ (DCs y macrófagos) (57), que representan el eslabón que conecta la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa. Sin embargo, se conocía poco sobre el impacto de estos vectores en las DCs humanas y su capacidad para presentar los antígenos heterólogos y activar células T específicas. Debido a estas razones decidimos, en primer lugar, evaluar el efecto que tiene la expresión de los antígenos del VIH-1 desde el candidato vacunal MVA-B sobre el patrón de expresión génica de estas células; y, en segundo lugar, estudiar *ex vivo* la capacidad de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (MDDCs) infectadas por MVA-B para presentar los antígenos del VIH-1 y activar a células T humanas autólogas de pacientes infectados con el virus.

Mediante la tecnología de microarrays realizamos un análisis

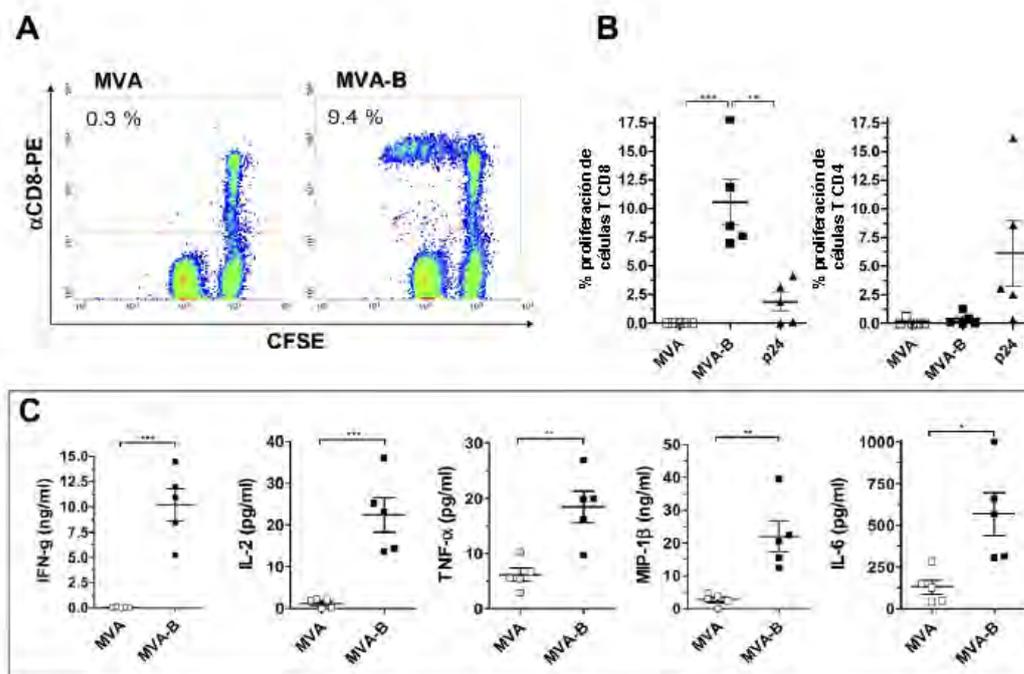


Figura 11: Proliferación de células T específicas frente al VIH-1 y secreción de citoquinas inducidas por células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) autólogas infectadas con MVA-B. A: Gráfico representativo de la dilución del marcador de proliferación CFSE mediante citometría de flujo en células T CD3+ CD8+ estimuladas con MDDCs autólogas infectadas con la cepa parental MVA o con el recombinante MVA-B. B: Porcentaje de proliferación de células T CD8+ y T CD4+ estimuladas con MDDCs autólogas infectadas con la cepa parental MVA, con el recombinante MVA-B o pulsadas con la proteína p24 soluble del VIH-1. C: Secreción de citoquinas después del cultivo de linfocitos T CD8+ y MDDCs infectadas con MVA o MVA-B. (***) $p < 0.005$, (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$.

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 -60



de los cambios transcripcionales que ocurrían en las MDDCs aisladas de varios donantes sanos tras la infección por MVA-B en comparación con la infección con la cepa parental MVA. Identificamos 442 genes regulados diferencialmente relacionados con la expresión de los antígenos del VIH-1, de los cuales 387 fueron regulados positivamente y 55 lo hicieron negativamente. Por categorías funcionales los genes regulados estaban implicados fundamentalmente en el tráfico de células inmunes, hematopoyesis, presentación antigénica y respuestas de células T y B. Un análisis más detallado de los datos reveló que la expresión de los genes del VIH-1 desde el virus MVA-B activa de forma eficiente la expresión de quimioquinas (CCL3, CCL4, CCL20, CXCL10, CXCL13 y CCR8), citoquinas (IFN- α , TNF- α e IFN- β) y proteínas quinasas implicadas en rutas de señalización (JAK1 e IRAK2). También se expresaron de forma diferencial genes involucrados en la ruta de procesamiento y presentación antigénica: el gen que codifica para la proteína MICA se reguló positivamente, mientras que los genes HLA-DRA y HSPA5 fueron regulados negativamente. Demostramos que la regulación de la expresión de MICA se debía al antígeno Env del VIH-1 expresado desde MVA-B y no de GPN. Los ensayos funcionales indicaron que esta proteína mejora la interacción entre las células diana infectadas por MVA-B y los linfocitos citotóxicos (58). Resultados similares fueron obtenidos cuando se analizó el perfil de expresión génica inducido por los antígenos del VIH-1 del subtipo C expresados por MVA-

C en células dendríticas mieloides (mDCs) y plasmacitoides (pDCs) (59).

En un modelo *ex vivo* investigamos el impacto de la infección por el candidato vacunal MVA-B en la biología de MDDCs de pacientes asintomáticos infectados por VIH-1 y evaluamos la capacidad de estas MDDCs infectadas para activar respuestas de células T específicas de VIH-1 en linfocitos T autólogos. Cuando analizamos el efecto de la infección *in vitro* de MDDCs por MVA-B observamos que las células infectadas presentan un fenotipo maduro, secretan altos niveles de citoquinas y quimioquinas (IL-1 α , IL-7, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-15, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IP-10, MIG e IFN- α) y adquieren capacidad para migrar hacia gradientes de quimioquinas linfoides (CCL19 o CCL21). Además, la infección por MVA-B indujo la apoptosis de las células infectadas y los cuerpos apoptóticos resultantes fueron engullidos por MDDCs no infectadas que presentaron de forma cruzada los antígenos del VIH-1 a los linfocitos T CD8 autólogos. El co-cultivo de MDDCs infectadas por MVA-B con linfocitos T autólogos indujo una respuesta de células T CD8 específicas del VIH-1 altamente funcional caracterizada por un aumento en su capacidad proliferativa, la secreción de IFN- γ , IL-2, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 α , RANTES e IL-6 y una fuerte actividad citotóxica contra linfocitos T CD4+ autólogos infectados por VIH-1 (reducción del 69.8 %) (Figura 11) (60).

Estos estudios demostraron *ex vivo* la capacidad del candidato vacunal MVA-B para estimular la maduración y activación de las

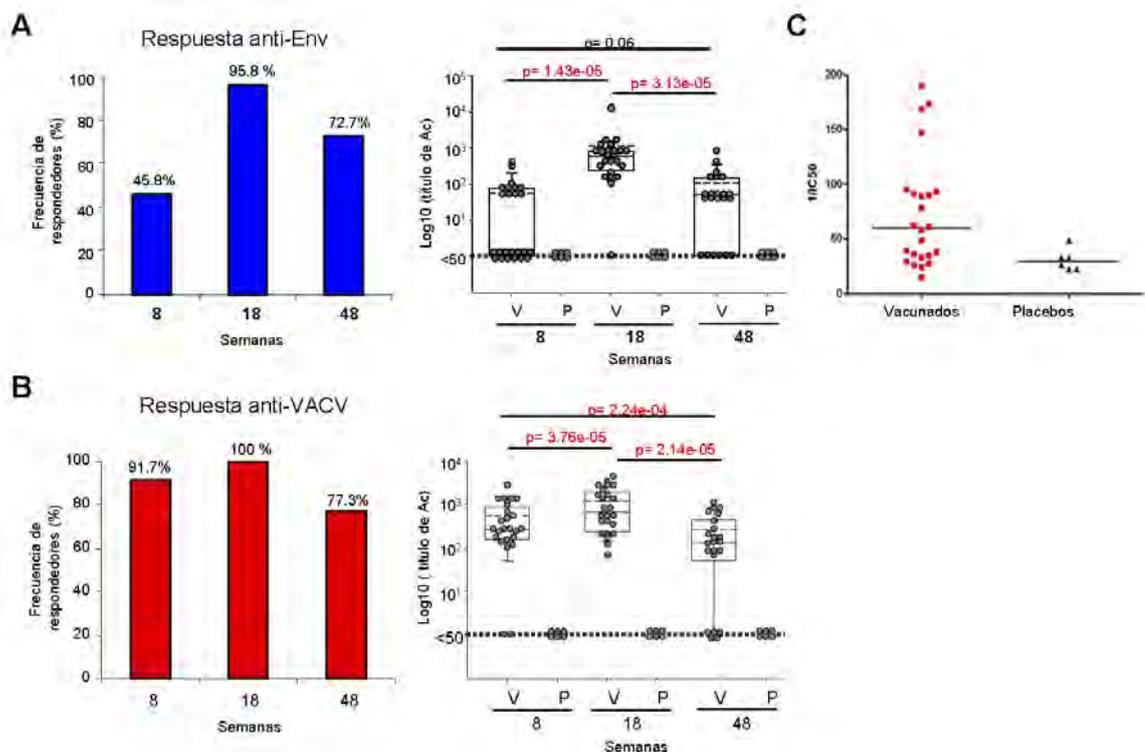


Figura 12: Respuesta humoral específica frente al VIH-1 y VACV en voluntarios del ensayo clínico RISVAC02. A: Frecuencia de respondedores y niveles de anticuerpos IgG de unión frente a la proteína Env del VIH-1. B: Frecuencia de respondedores y niveles de anticuerpos IgG de unión frente a los antígenos de VACV. C: Niveles de anticuerpos neutralizantes frente al aislado autólogo BX08 del VIH-1. La línea discontinua representa el umbral considerado como respuesta positiva. V: vacunados; P: placebo.



células dendríticas derivadas de monocitos humanos e inducir la activación de células T CD8 específicas frente al VIH-1 polifuncionales y con capacidad citotóxica para eliminar de forma efectiva células T CD4 infectadas por VIH-1.

3.4. MVA-B como vacuna profiláctica

Los resultados derivados de la evaluación preclínica en diferentes modelos animales y en experimentación ex vivo demostraron que el candidato vacunal MVA-B cumplía las exigencias de seguridad e inmunogenicidad necesarias para ser evaluado en ensayos clínicos. Debido a esto, se presentó al Ministerio de Sanidad Español una propuesta para evaluar MVA-B como vacuna profiláctica frente al VIH/SIDA en un ensayo clínico fase I. Después de recabar toda la información solicitada y cumplir con las exigencias requeridas, las autoridades regulatorias aprobaron el ensayo clínico, denominado RISVAC02, con identificador NCT00679497.

El estudio RISVAC02 tenía como objetivo evaluar la seguridad e inmunogenicidad del candidato vacunal MVA-B con fines profilácticos. El ensayo aleatorizado, multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo, incluyó un total de 30 individuos sanos, que fueron seleccionados de un total de 356 que se ofrecieron a participar en esta investigación pionera. Los voluntarios, en su mayoría hombres (80%), con rangos de edad entre 19 y 48 años, estaban sanos, tenían bajo riesgo de infección por VIH-1 y no presentaban inmunidad preexistente frente al virus de la viruela. Se distribuyeron entre los hospitales universitarios Gregorio Marañón, en Madrid, y Clinic, en Barcelona, y fueron asignados al azar (con aleatorización equilibrada (1:1) a través

de una lista de aleatorización generada por ordenador sin ninguna restricción) para recibir 3 inyecciones intramusculares (1×10^8 ufp/dosis) de MVA-B ($n = 24$) o placebo ($n = 6$) a las semanas 0, 4 y 16. El seguimiento se realizó hasta la semana 48 (1 año).

Desde el punto de vista de seguridad podemos decir que la vacuna MVA-B fue segura y bien tolerada. Durante todo el período de seguimiento se registraron un total de 169 efectos adversos (EA) (158 en el grupo de vacunados y 11 en el grupo placebo), la mayoría de grado 1-2. Los EA más frecuentes que se reportaron fueron cefaleas, dolor en la zona de la inyección o malestar general.

Desde el punto de vista inmunológico detectamos respuestas celulares específicas frente al VIH-1 en el 75 % de los voluntarios vacunados por la técnica de ELISPOT, que cuantifica el número de células T productoras de IFN- γ específicas frente a grupos de péptidos representativos de los 4 antígenos del VIH-1 expresados por MVA-B (Env, Gag, Pol y Nef). La frecuencia de respondedores aumentó significativamente después de la segunda dosis de la vacuna, del 33 % al 67 %, y se mantuvo después de la tercera dosis y hasta el final del estudio. La respuesta detectada estaba dirigida fundamentalmente frente a los grupos de péptidos representativos del antígeno Env, aunque después de la tercera dosis la respuesta fue más balanceada.

En cuanto a la respuesta humoral, el 96% de los vacunados desarrollaron anticuerpos de unión específicos frente a la proteína de la envuelta gp160 del subtipo B después de tres dosis de MVA-B, que se mantuvo en el 73% de los vacunados al cabo del año (Figura 12A). Del mismo modo, el 100% de los vacunados des-

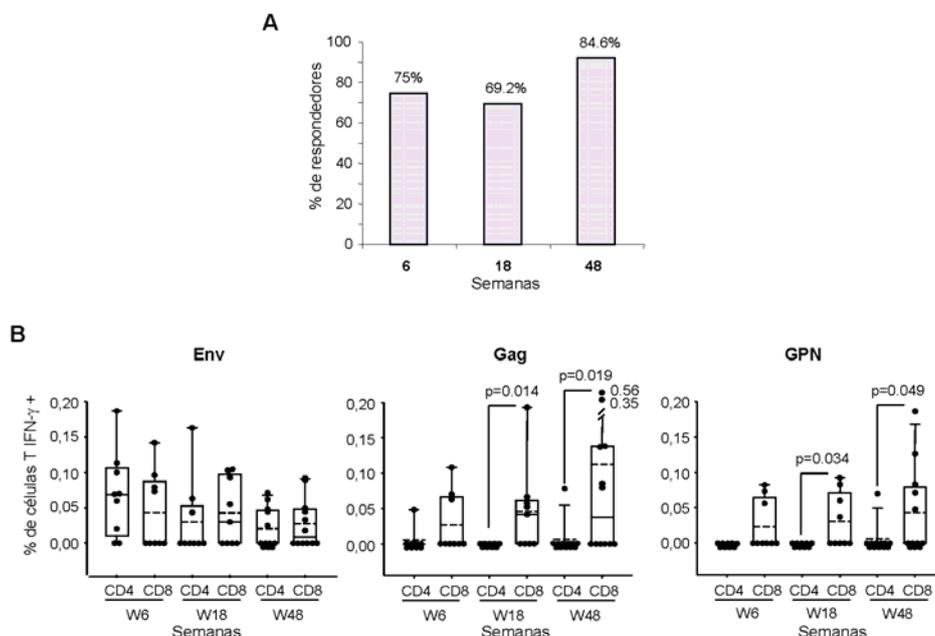


Figura 13: Respuesta celular específica frente al VIH-1 en voluntarios del ensayo clínico RISVAC02. A: Frecuencia de respondedores a los diferentes tiempos. B: Porcentajes de células T CD4 y T CD8 que producen IFN- γ frente a los antígenos Env, Gag o GPN del VIH-1.

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 -60



arrollaron anticuerpos de unión específicos frente al vector después de tres dosis de MVA-B que se mantuvo en el 77 % de los vacunados al cabo del año (Figura 12B). Interesantemente, el 54 % de los vacunados desarrollaron anticuerpos neutralizantes frente al aislado homólogo BX08 del VIH-1, aunque los títulos detectados eran bajos (Figura 12C) (61).

Aunque el ensayo de ELISPOT es la técnica estandarizada que se utiliza internacionalmente para medir la respuesta inmune celular inducida por los diferentes candidatos vacunales frente al VIH-1 que se ensayan en clínica, proporciona una información muy limitada. Debido a ello se han ido implementando otros métodos analíticos más complejos, entre los que destaca sin lugar a dudas la citometría de flujo multiparamétrica que permite caracterizar una célula por su fenotipo de superficie y, al mismo tiempo, conocer el patrón de secreción de citoquinas, quimioquinas, capacidad proliferativa o capacidad citotóxica entre otras. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad facilita la aplicación de esta técnica en la rutina clínica. Por estas razones decidimos implementarla para llevar a cabo una caracterización más detallada de la respuesta inmune celular inducida por el candidato vacunal MVA-B. El estudio se realizó en 16 voluntarios de los 30 que se incluyeron en el ensayo RISVAC02 (13 vacunados y 3 placebos) que habían sido reclutados en el Hospital Gregorio Marañón (Madrid) y utilizamos linfocitos de sangre periférica frescos aislados el mismo día de la toma de muestra de los pacientes. La caracterización de la magnitud, polifuncionalidad y fenotipo de memoria de las células T CD4 y CD8 específicas frente al VIH-1 inducidas tras la vacunación se realizó empleando la técnica de tinción de citoquinas intracelulares y

evaluando específicamente los niveles de secreción de IFN- γ , IL-2, TNF- α y MIP-1 β . De forma general podemos destacar que la vacunación con MVA-B estimuló respuestas de células T CD4 (69,2 %) y CD8 (92,3 %) específicas frente al VIH-1 en los individuos vacunados. La frecuencia de respondedores después de dos dosis de MVA-B fue similar a la obtenida después de la tercera dosis de la vacuna (75 % versus 69,2 %). Las células T CD4+ estaban dirigidas frente al antígeno Env, mientras que las células T CD8+ reconocían a los antígenos Env, Gag, Pol y Nef de manera similar (Figura 13).

Entre el 25 % - 45 % de las células T específicas mostraban un perfil polifuncional, caracterizado por la secreción simultánea de dos o más citoquinas. Al año de haber comenzado el ensayo con MVA-B analizamos la magnitud, frecuencia y fenotipo de las células T específicas de memoria incluyendo en el panel de reactivos los anticuerpos que reconocen las moléculas de superficie CD45RA y CCR7 que definen las siguientes poblaciones de células T de memoria: centrales de memoria (TCM; CD45RA-CCR7+, efectoras de memoria (TEM; CD45RA+CCR7-) o efectoras de memoria diferenciadas (TEMRA; CD45RA+CCR7-). Observamos que la magnitud y la frecuencia de la respuesta de células T específicas se mantuvieron sin diferencias significativas con respecto a la detectada después de tres dosis de la vacuna. Las células T CD4 específicas de memoria se distribuían entre los fenotipos TEM y TCM, mientras que las células T CD8 específicas de memoria se distribuían principalmente entre los fenotipos TEM y TEMRA (Figura 14) (62).

La presencia de células T con fenotipo TEM o TEMRA se ha correlacionado con el control de la infección por VIH-1 (63); del mismo

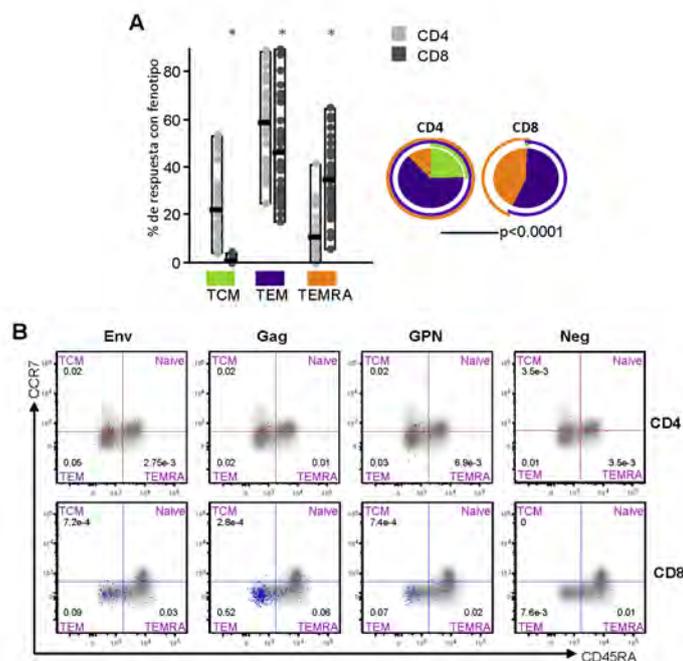


Figura 14: Fenotipo de la respuesta de células T específicas de memoria frente al VIH-1. A: Distribución de las células T CD4+ y T CD8+ de memoria según la expresión de los marcadores CCR7 en combinación con CD45RA. B: Perfiles fenotípicos representativos de las células T CD4 y CD8 específicas de memoria frente al VIH-1. (*) p < 0.05.

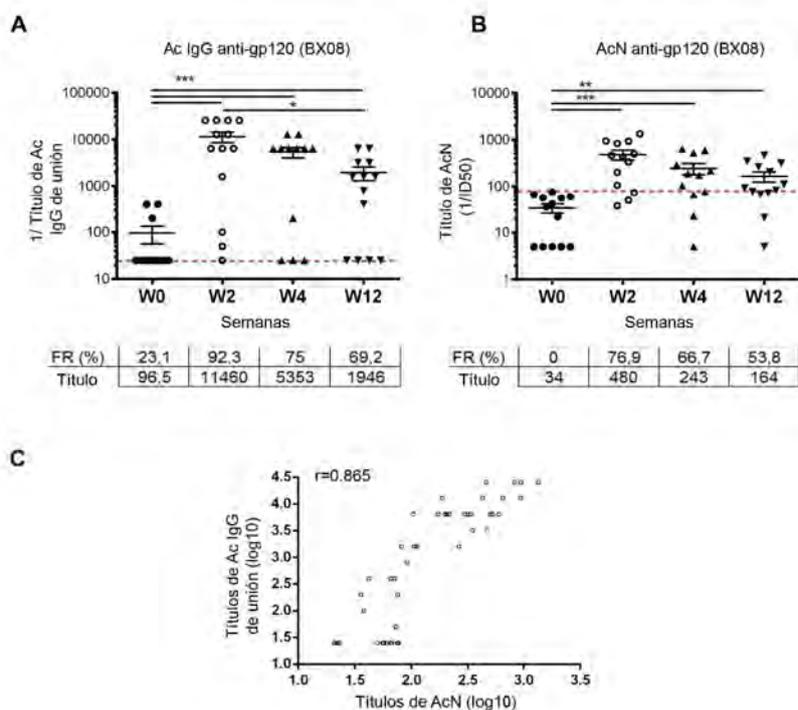


Figura 15: Respuesta humoral específica frente al VIH-1 después de una cuarta dosis de MVA-B administrada a los cuatro años de haber comenzado el estudio RISVAC02. A: Niveles de anticuerpos IgG de unión frente a la proteína Env del VIH-1. B: Niveles de anticuerpos neutralizantes frente al aislado autólogo BX08 del VIH-1. C: Correlación entre títulos de anticuerpos IgG de unión frente a la proteína Env y títulos de anticuerpos neutralizantes frente al aislado autólogo BX08 del VIH-1.

modo, estas poblaciones han sido relevantes en el control temprano de la infección por el virus de simio altamente patogénico (64), de ahí la importancia de que sean estimuladas por el candidato vacunal MVA-B.

Después de 4 años de haber comenzado el ensayo clínico RISVAC02, tratamos de contactar con los 24 voluntarios vacunados con MVA-B para ver si accedían a recibir una cuarta dosis del vector. El estudio se explicó en detalle a todos los participantes que se pudieron localizar y que cumplían los criterios de elegibilidad. De ellos, 13 dieron su consentimiento informado por escrito para recibir una inyección intramuscular (1×10^8 ufp/dosis) de MVA-B y someterse a un seguimiento por 12 semanas para evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de la dosis tardía administrada. El estudio denominado RISVAC02 boost fue aprobado por los comités éticos institucionales de los Hospitales Clinic y Gregorio Marañón y por las autoridades regulatorias españolas. Los voluntarios fueron en su mayoría hombres (92.3 %), con rangos de edad entre 24 y 53 años. Después de la vacunación se registraron un total de 64 efectos adversos, la mayoría de grado 1 (96 %), y no se informó ninguno de grados 3 o 4, confirmando el perfil de seguridad de MVA-B. Al analizar la respuesta celular mediante la técnica de ELISPOT, observamos que previamente a la administración de la cuarta dosis de la vacuna el 20 % de los participantes mantenían respuestas celulares específicas frente al VIH-1, aunque de baja magnitud. Esta frecuencia experimentó un pequeño incremento

tras la cuarta dosis de MVA-B (38%) y se mantuvo hasta la semana 12. El análisis por citometría de flujo multiparamétrica confirmó estos resultados. Después de 4 años, solo un 12.5% de los voluntarios mantenían respuestas de células T CD4+ y T CD8+ específicas. Esta frecuencia se incrementó hasta el 45% a las semanas 2 y 4 después del "boost" tardío con MVA-B, volviendo a los niveles basales a la semana 12. La respuesta T CD4+ estaba dirigida frente a Env, mientras que la respuesta CD8+ se dirigía de forma similar frente a los 4 antígenos. El 20 % de las células T CD4+ y el 35 % de las células T CD8+ secretaban simultáneamente dos o más citoquinas. La respuesta frente al vector por su parte se mantuvo en el 12.5 % de los vacunados al cabo de los 4 años; sin embargo, a la semana 4 después de la cuarta dosis de MVA-B, se detectó en el 80 % de los vacunados una respuesta T CD8+.

En cuanto a la respuesta humoral, sí logramos detectar un efecto positivo tras la cuarta inmunización. El porcentaje de voluntarios con niveles de anticuerpos de unión específicos frente a la proteína gp120 homóloga se incrementó del 21.3 % detectado al cabo de los 4 años, hasta el 92.3 % a la semana 2 después del "boost" tardío (Figura 15A). Los títulos de anticuerpos neutralizantes también se incrementaron significativamente, llegando a valores en el orden de 104 a este tiempo (Figura 15B). Este título medio fue 10 veces mayor que el detectado después de 3 dosis de MVA-B en el ensayo RISVAC02 y se encontraba en el mismo rango que el reportado en el ensayo de eficacia

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.



RV144 (54, 55) o en otros estudios que emplean recombinantes basados en MVA (65, 66). Estos datos resaltan la capacidad del vector MVA-B para inducir respuestas de anticuerpos de larga duración frente a la proteína Env del VIH-1, probablemente proporcionando señales de supervivencia a las células B que les permiten expandirse eficientemente después de un refuerzo tardío. Además, la cuarta dosis de MVA-B fue capaz de inducir anticuerpos neutralizantes en suero frente al aislado homólogo del VIH-1 en más del 75% de los voluntarios, que se correlacionaron de forma positiva con los niveles de anticuerpos de unión frente a gp120 (Figura 15C) (67).

Los datos derivados de este ensayo clínico fueron publicados en las revistas "Vaccine", "J. Virol." y "PLOSone", con mi contribución como primera autora en 2 de ellos. En conjunto, este estudio demostró que la inoculación de tres dosis del candidato vacunal MVA-B en voluntarios sanos siguiendo un protocolo homólogo es segura, tolerable e inmunogénica, induciendo respuestas inmunes celulares y humorales específicas y duraderas frente al VIH-1 en el 75% y 95% de los vacunados, respectivamente, e involucrando a subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ polifuncionales. Por otra parte, una cuarta dosis de la vacuna al cabo de los 4 años indujo aumentos moderados en las respuestas de células T específicas frente al VIH-1, pero aumentó significativamente las respuestas de anticuerpos frente a la proteína Env del VIH-1, así como la generación de anticuerpos neutralizantes frente al aislado homólogo.

El ensayo clínico RISVAC02 fue el primer estudio fase I en humanos realizado en España con un candidato vacunal frente al VIH/SIDA. Se realizó con fondos de organizaciones públicas y fundaciones privadas españolas en un marco colaborativo y multidisciplinario en el que los voluntarios representaron el pilar fundamental. Representó un desafío para todos los centros que estuvimos involucrados, pero el trabajo mereció la pena. Demostramos que tenemos las infraestructuras necesarias para afrontar con rigor científico proyectos de gran envergadura y hacer posible la traslación de candidatos vacunales desde la preclínica a los ensayos clínicos, una tarea que solo unos pocos afortunados logran ver cumplir. Además, estos estudios de vacunación frente al VIH tuvieron una gran difusión en los medios (prensa, radio y televisión) tanto nacionales como internacionales.

3.5. MVA-B como vacuna terapéutica

Aunque la morbilidad y la mortalidad de la infección por VIH-1 han disminuido drásticamente debido a la introducción de la terapia antirretroviral combinada (TAR), el tratamiento a largo plazo puede ocasionar resistencia a la medicación y toxicidad, sin olvidar el elevado coste económico que representa su implementación, sobre todo para países en desarrollo que poseen altas tasas de individuos infectados. Debido a ello, resulta necesario explorar nuevas estrategias terapéuticas que restauren y/o potencien respuestas inmunes específicas frente al VIH-1 que permitan controlar la replicación viral en ausencia

de TAR durante períodos prolongados de tiempo. Sin embargo, el desarrollo racional y seguro de estas intervenciones se dificulta por la falta de parámetros bien definidos relacionados con el control inmune del VIH-1 y la incertidumbre con respecto a las evaluaciones más adecuadas que deben aplicarse en los ensayos de vacunas clínicas.

Los resultados de seguridad e inmunogenicidad obtenidos en el estudio RISVAC02 avalaron la propuesta presentada al Ministerio de Sanidad Español para evaluar MVA-B como vacuna terapéutica frente al VIH/SIDA. El ensayo clínico fase I, denominado RISVAC03, fue aprobado por las autoridades regulatorias con identificador NCT01571466 y tenía como objetivos, por un lado, evaluar la seguridad e inmunogenicidad del candidato vacunal MVA-B en pacientes crónicos infectados con VIH-1 que estaban en tratamiento antirretroviral (TAR) y, por otro lado, determinar su capacidad de actuar sobre el reservorio de virus latente y el rebote de la carga viral tras la interrupción controlada de la terapia cuando se administra solo o en combinación con disulfiram, un medicamento utilizado para reactivar el reservorio viral.

Previamente a la realización de este estudio, nuestro grupo evaluó en qué medida los diferentes inhibidores virales que conforman la terapia antirretroviral en las unidades de VIH de los hospitales españoles podrían afectar a la replicación del candidato vacunal MVA-B en cultivos celulares establecidos y en células dendríticas humanas. Observamos que los inhibidores de VIH-1 ensayados no ejercían ningún efecto sobre la cinética de crecimiento del virus MVA-B *in vitro*, incluso a concentraciones más altas que las empleadas normalmente en el tratamiento. Además, tampoco se vieron afectadas ni la cinética ni los niveles de expresión de las proteínas gp120 y GPN expresadas por MVA-B (68).

RISVAC03 fue un ensayo aleatorizado, multicéntrico y doble ciego en el que participaron 30 voluntarios con infección crónica por VIH-1 controlados por TAR y con recuentos de células T CD4 > 450 células/mm³. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y fueron asignados al azar (aleatorización equilibrada (2:1)) para recibir tres inyecciones intramusculares (1 × 10⁸ ufp/dosis) de MVA-B (n=20) o placebo (n=10) a las semanas 0, 4 y 16. A las 8 semanas después de la última dosis de MVA-B (semana 24) se interrumpió la terapia antirretroviral y se evaluó la dinámica del rebote viral durante las primeras 12 semanas tras la interrupción. A un subconjunto de pacientes (8 vacunados y 4 placebos) no se les interrumpió la TAR en la semana 24 y recibieron una cuarta dosis de MVA-B en la semana 36 combinada con disulfiram (250 mg una vez al día) durante 3 meses (desde la semana 36 a la semana 48). En este grupo, la interrupción de la terapia se realizó en la semana 48 y se evaluó la dinámica del rebote viral igual que en el grupo principal. En el estudio estuvieron implicados los Hospitales Germans Trias i Pujol y Clinic de Barcelona y el Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Durante todo el seguimiento del estudio se reportaron un total de 326 efectos adversos (257 en el grupo de los vacunados y 69

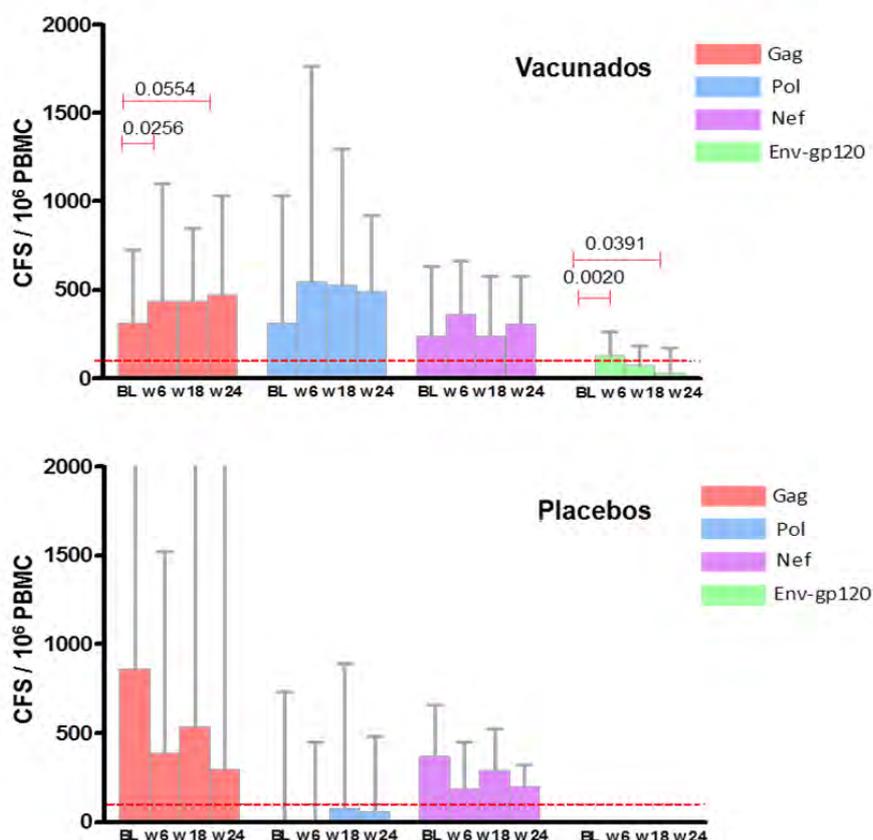


Figura 16: Respuesta celular específica frente a los antígenos Env, Gag, Pol y Nef del VIH-1 en voluntarios del ensayo clínico RISVAC03. Los valores representan el número de células secretoras de IFN- γ / 10⁶ PBMCs frente a los antígenos del VIH-1 presentes en la vacuna MVA-B en los individuos vacunados (panel superior) y en los receptores de placebo (panel inferior) antes de la vacunación (BL), después de dos (W6) o tres (W18) dosis de MVA-B o en el momento de la interrupción de la terapia (W24). La línea discontinua representa el umbral considerado como respuesta positiva.

en el grupo placebo). El 90% de los EA en el grupo vacunado fueron de grado 1 y el 8% de grado 2. Los clasificados como grado 3 y 4 no estuvieron relacionados con la vacunación. Los EA más comunes que se registraron fueron dolor y malestar general. Estos datos confirman que el vector MVA-B es seguro y bien tolerado, incluso en pacientes seropositivos.

Cuando analizamos la respuesta celular inducida por MVA-B mediante la técnica de ELISPOT observamos que en comparación con los receptores de placebo, los voluntarios vacunados con MVA-B mostraron un aumento tanto en la magnitud de la respuesta de células T específicas frente al VIH-1, alcanzando los máximos valores después de la segunda inmunización (semana 6), como en su amplitud, llegando a reconocer 7 grupos de péptidos representativos de los antígenos incluidos en el vector MVA-B después de tres dosis de la vacuna (semana 18). MVA-B logró expandir fundamentalmente las respuestas pre-existentes frente a Gag (Figura 16) (69).

Para ampliar estos resultados, evaluamos por citometría de flujo multiparamétrica la magnitud, amplitud y polifuncionalidad de las respuestas celulares específicas frente al VIH-1 inducidas y/o expandidas por el vector MVA-B en comparación con el grupo placebo. El estudio se realizó en 22 de los 30 voluntarios reclutados (14 vacu-

nados y 8 placebos) debido a la disponibilidad de muestras. A diferencia del grupo receptor de placebo, la vacunación con MVA-B mejoró significativamente la frecuencia, magnitud y amplitud de las respuestas de células T CD4 específicas frente a los antígenos Gag y GPN del VIH-1. El número total de respuestas T CD4+ detectadas en el grupo de vacunados se incrementó desde 5 (semana 0) hasta 22 tras tres dosis de MVA-B, y se mantuvo en 16 en el momento de la interrupción de la terapia antirretroviral. No obstante, es difícil distinguir si las nuevas respuestas que se detectaron provenían de células T CD4 vírgenes o de células T CD4+ preexistentes y cuyos niveles se encontraban por debajo del nivel umbral de detección de la técnica. Por el contrario, no hubo ninguna variación temporal significativa en las respuestas de células T CD8+ asociada con la administración de la vacuna (Figura 17).

Cuando analizamos el perfil funcional de la respuesta frente al VIH-1 observamos que tanto en el grupo de vacunados como en el grupo placebo las células T específicas preexistentes eran altamente polifuncionales. En el grupo de voluntarios vacunados, el 40% de las células T CD4+ y el 60% de las células T CD8+ exhibían al menos dos funciones efectoras. La inmunización con MVA-B indujo un au-

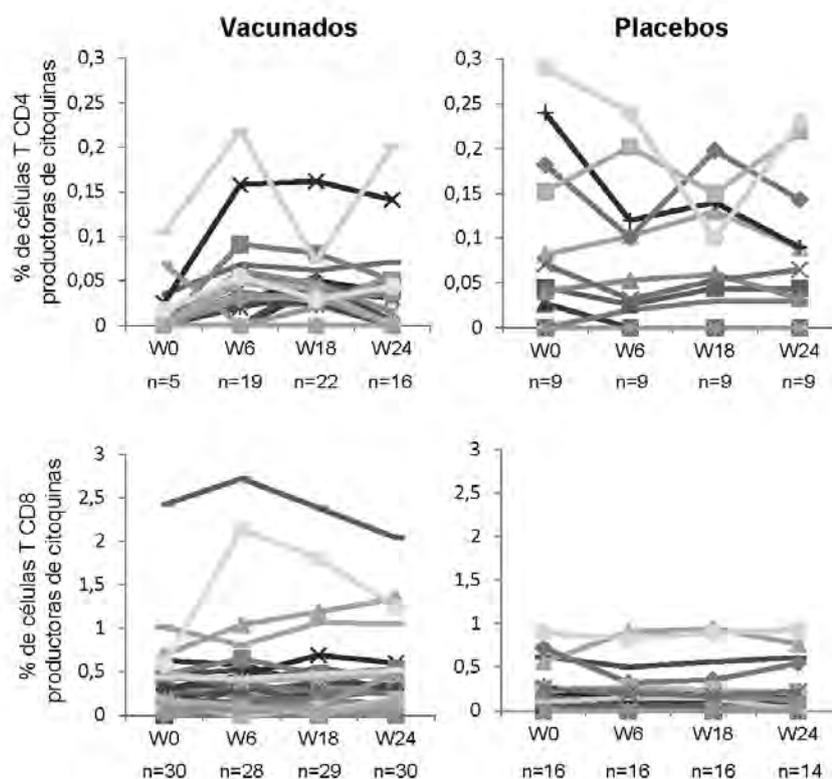


Figura 17: Respuesta de células T CD4 y T CD8 específicas frente al VIH-1 en voluntarios del ensayo clínico RISVAC03 determinada por citometría de flujo multiparamétrica. Los gráficos representan la cinética de la respuesta de células T CD4 (panel superior) y CD8 (panel inferior) específicas frente al VIH-1 (Env + Gag + GPN) para cada uno de los individuos vacunados o receptores de placebo incluidos en el ensayo a lo largo del tiempo. n representa el número de respuestas positivas frente a Env, Gag y GPN a cada tiempo analizado.

mento de la frecuencia tanto de las células T CD4+ que secretan simultáneamente $IFN-\gamma + IL-2 + TNF-\alpha$, como de las células T CD8+ que secretan simultáneamente $CD107\alpha + IFN-\gamma + TNF-\alpha$. La vacunación también mejoró las frecuencias de células T CD4+ con fenotipo efector de memoria (70).

Cuando se analizó el efecto de la vacunación sobre la respuesta humoral observamos que no hubo ninguna variación temporal significativa ni en los niveles de anticuerpos de unión a Env ni en su capacidad neutralizante que pudiera asociarse con la administración de MVA-B. La gran mayoría de los participantes presentaban niveles altos y variables de anticuerpos de unión a gp120 (100 % en ambos grupos) y a la región V1/V2 de gp120 (75 % y 67 % en vacunados y placebo, respectivamente) al inicio del estudio, que se mantuvieron sin cambios a lo largo del mismo. Igualmente, la actividad neutralizante de los anticuerpos frente al aislado homólogo fue muy variable entre los diferentes pacientes, pero no hubo cambios significativos después de la vacunación.

Después de la interrupción de la terapia se cuantificaron niveles detectables de carga viral en el plasma (pVL) de todos los pacientes. Sin embargo, hubo un retraso moderado, pero significativo,

en la cinética de rebote viral en los voluntarios que recibieron MVA-B, pero no el disulfiram, durante las primeras 4 semanas después de la interrupción (Figura 18).

El tratamiento con disulfiram no demostró tener ningún efecto en términos de reactivación del VIH-1 latente. El tamaño del reservorio proviral latente en células T CD4+ circulantes en la semana 48 (12 semanas después del tratamiento con disulfiram) no difirió significativamente del detectado en la semana 36. A pesar de que no hubo correlación debido al tamaño muestral, observamos que en el momento en que se interrumpió la terapia antiretroviral (semana 24), los individuos vacunados que tenían un retraso en la cinética de rebote viral presentaban frecuencias más elevadas de células T CD8 específicas frente a Gag, porcentajes más altos de células T CD4 específicas frente al VIH-1 con fenotipo efector de memoria y títulos más altos de anticuerpos de unión anti-V1/V2 de gp120. Sin embargo, estos parámetros inmunológicos no fueron suficientes para el control del VIH-1 en los voluntarios vacunados. Esta observación podría estar relacionada con el aumento moderado que se induce tras la vacunación de los niveles del marcador de agotamiento celular PD-1 detectados en la población de células T CD8+ (71).

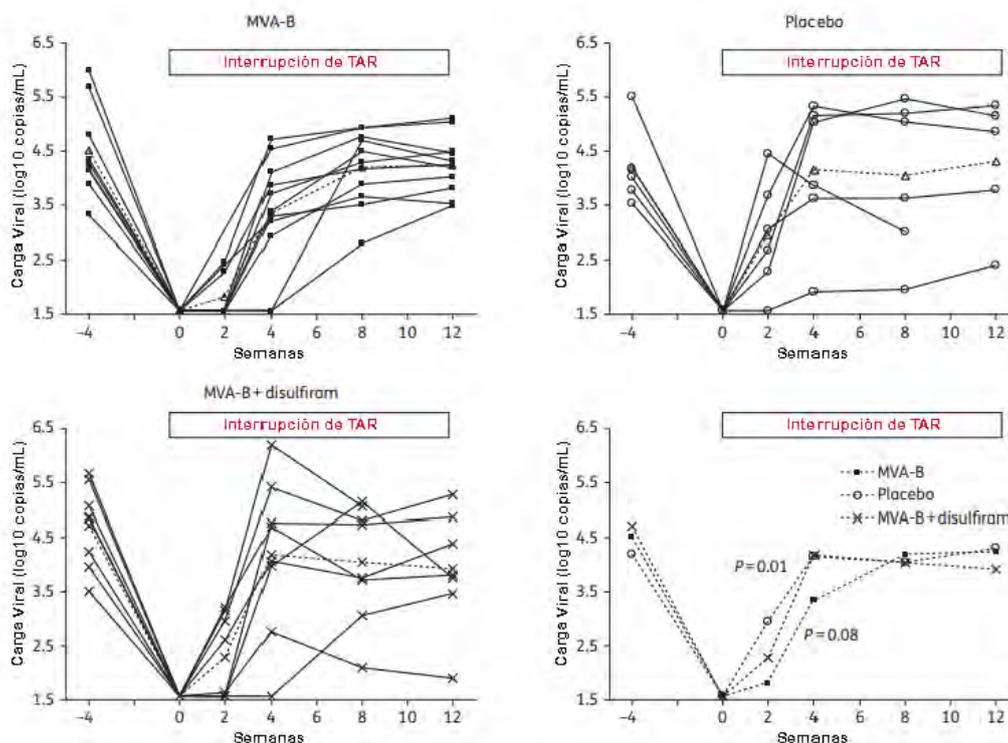


Figura 18: Rebote de la carga viral del VIH-1 después de la interrupción de la terapia antirretroviral (TAR). Se representan los valores individuales de carga viral plasmática (pVL) antes del inicio de TAR (-4) y durante el período de interrupción controlada de TAR en los diferentes grupos.

Si bien los resultados de cohortes transversales de infección natural por VIH apuntan a varios marcadores inmunes asociados con la carga viral, no se han identificado parámetros inmunes sólidos que puedan servir como predictores confiables del control viral en pacientes que reciben vacunas terapéuticas e interrumpen el tratamiento antirretroviral (72). En este sentido, el ensayo RISVAC03 permitió integrar parámetros virológicos e inmunológicos que podrían pronosticar el retraso clínicamente modesto, pero estadísticamente significativo, que se produjo en la cinética de rebote viral de los individuos vacunados con MVA-B y así definir predictores del control viral. Para ello, se analizaron las respuestas inmunes de células T y B específicas que se desarrollaron tras la interrupción del tratamiento, se realizaron estudios filogenéticos de la población viral antes y después de la interrupción, determinando el número de mutaciones de escape presentes en Gag asociadas al antígeno leucocitario humano-I (HLA-I) y se midió de forma precisa los niveles de ADN proviral del VIH-1 en células T CD4 de los voluntarios antes de la vacunación y después de la interrupción de la terapia. Todos estos parámetros se integraron en un modelo de regresión lineal que también tenía en consideración la presencia de alelos protectores de HLA-I (B57, B270 y B51), si los voluntarios habían sido receptores de vacuna o de placebo, la administración de disulfiram, los conteos de células T CD4 y la carga viral en plasma antes del tratamiento. De todos ellos, la única variable que se asoció independientemente con el tiempo de retraso del rebote viral fue el nivel de ADN

proviral del VIH-1 presente antes de la vacunación. Un nivel bajo de ADN proviral del VIH-1 antes de la vacunación se asoció de forma independiente con un retraso en el rebote viral y un pico de viremia menor después de la interrupción del tratamiento. A su vez, un pico de viremia pequeño también se correlacionó positivamente con un número reducido de polimorfismos en la secuencia de Gag asociados a alelos HLA-I presentes en la población de virus de rebote. Estos resultados sugieren que tanto los niveles de ADN proviral del VIH-1 como la cantidad de polimorfismos en Gag asociados a HLA-I pueden ser considerados como parámetros virológicos que influyen en el resultado clínico de las interrupciones estructuradas del tratamiento. A pesar de que estos datos deberán ser validados en ensayos clínicos más extensos, su incorporación en futuros ensayos de vacunas terapéuticas podría contribuir a la implementación de interrupciones del tratamiento mucho más seguras (73).

En conjunto, los resultados del ensayo clínico RISVAC03 demostraron que el vector MVA-B es seguro, tolerado e inmunogénico en pacientes con infección crónica por VIH-1 controlados por tratamiento antirretroviral. La vacunación por MVA-B expandió y también indujo nuevas respuestas de células T CD4 específicas, polifuncionales y de fenotipo TEM dirigidas principalmente frente a los antígenos Gag y GPN y, aunque mantuvo la especificidad de antígeno, frecuencia, amplitud, polifuncionalidad y perfil fenotípico de las respuestas de células T CD8 específicas pre-existentes, también provocó un aumento mode-

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.



rado de su agotamiento. Independientemente del beneficio inmunológico, la respuesta inducida por MVA-B no es capaz de controlar el rebote viral que se produce tras la interrupción del tratamiento antirretroviral, lo que indica que es necesario optimizar su uso empleando estrategias combinadas de vacunación en protocolos heterólogos junto a otros vectores e incluso utilizando inmunomoduladores que reviertan el estado de agotamiento que presentan de base las células T CD8+ en pacientes crónicos y que de forma moderada se incrementa tras la vacunación.

4. PERSPECTIVA ACTUAL Y EXPERIMENTACIÓN FUTURA

Existe un consenso a nivel científico de que el candidato vacunal ideal frente al VIH debe ser capaz de estimular tanto una respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizante que proteja frente a la infección viral como una respuesta celular potente que garantice la eliminación de las células infectadas. Sin embargo, el desafío para obtener este candidato ideal radica en que los antígenos virales, los sistemas de administración, los adyuvantes y el entorno de citoquinas y quimioquinas que promueven la respuesta humoral deseada no son los mismos que garantizan una respuesta celular potente. Por ello, la opción más realista para superar este desafío consiste en la combinación de candidatos vacunales que de forma independiente estimulen una de estas ramas del sistema inmune, empleando protocolos heterólogos de inmunización.

El ensayo clínico RV144 ha ido marcando el ritmo sobre los parámetros inmunológicos que deben tenerse en consideración a la hora de evaluar nuevas estrategias vacunales frente al VIH-1; de ahí que la mayoría de los ensayos determinen el nivel de anticuerpos no neutralizantes frente a la región V1/V2 de gp120 o la función efectora ADCC de los anticuerpos IgG generados frente a la envuelta como una estrategia para identificar un régimen de vacuna eficaz. De hecho, cada vez se investiga más en la identificación de correlatos inmunes asociados a riesgo de infección utilizando muestras procedentes de los ensayos de eficacia que se han realizado en humanos y de estudios en primates no humanos. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se sugiere que en próximos ensayos de eficacia se tengan en consideración además de los parámetros descritos en el ensayo RV144, la función efectora ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpos) de los anticuerpos IgG generados frente a la envuelta, la presencia de anticuerpos de isotipo IgG3 con reactividad cruzada y el nivel de células T CD8+ polifuncionales como correlatos inmunes mecánicos de protección, ya que todos ellos estuvieron asociados a un menor riesgo de infección por VIH-1 en los ensayos evaluados (74).

Por otra parte, además de los correlatos empíricos derivados de los diferentes ensayos, se ha determinado el tipo de respuesta inmune que se genera en un grupo de pacientes seropositivos que controlan de forma natural la infección sin necesidad de terapia antirretroviral llamados controladores de élite. En ellos se ha eviden-

ciado: (i) la presencia de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, incluso dirigidos frente a diferentes determinantes antigénicos del trímero de gp120; (ii) la existencia de respuestas celulares mediadas por linfocitos T CD8+ con perfil polifuncional, principalmente frente al antígeno Gag del VIH-1; y (iii) la detección de anticuerpos de unión frente a la proteína de la envuelta con isotipos más funcionales (IgG3), con mayor afinidad por receptores de Fc y mejores funciones efectoras (ADCC). Estos hallazgos también han dirigido el curso de la generación de nuevas estrategias vacunales hacia la búsqueda de candidatos que mimeticen esta inmunidad. Por un lado, se desarrollan inmunógenos que generen anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, por ejemplo, mediante el diseño de vacunas guiadas por estructuras moleculares o usando proteínas de la envuelta en conformación nativa; y, por otro lado, se ha seguido explorando en la búsqueda de inmunógenos potenciadores de la respuesta celular también de amplio espectro. En este sentido, las construcciones sintéticas que emplean regiones conservadas del proteoma viral implicadas funcionalmente con protección o el desarrollo de proteínas tipo Mosaico constituyen las aproximaciones más prometedoras.

Los ensayos clínicos RISVAC02 y RISVAC03 evidenciaron que la administración de MVA-B en un sistema homólogo de vacunación con fines profilácticos o terapéuticos, a pesar de ser inmunogénica, no logra controlar el rebote viral una vez interrumpida la terapia, evidenciando la necesidad de realizar cambios significativos que permitan mejorar estos resultados. En este sentido, y desde la perspectiva de los avances más relevantes en campo, hemos optado tanto por optimizar los antígenos incluidos en el vector, como por explorar estrategias heterólogas que combinen varios vectores para así potenciar la calidad de la respuesta inmune generada.

Para evitar la inmunodominancia que ejerce el antígeno de la envuelta del VIH-1 sobre los antígenos Gag-Pol-Nef que se co-expresan desde el vector vacunal MVA-B y detectada tanto en el ensayo profiláctico como en el terapéutico, hemos diseñado un inmunógeno multi-epitópico destinado a activar células T, denominado TMEP-B.

Este antígeno sintético incluye aquellas regiones de las proteínas Gag, Pol y Nef del VIH-1 pertenecientes al subtipo B que están ampliamente conservadas entre los diferentes aislados virales circulantes y que se han asociado funcionalmente con el control viral. Este tipo de aproximación basada en el uso de epítomos en vez de en antígenos completos ofrece una serie de ventajas entre las que destacan su seguridad, inmunogenicidad y una mayor cobertura poblacional ya que permite tanto la inclusión de aquellas regiones antigénicas relevantes para la protección que pueden unirse a un número máximo de moléculas de HLA) cubriendo toda la diversidad poblacional, como la exclusión de aquellas secuencias que se han relacionado con virulencia. Los inmunógenos basados en elementos altamente conservados del VIH-1 se desarrollan bajo la premisa de que las mutaciones que se generan en las regiones conservadas como consecuencia de un mecanismo



viral de evasión de la respuesta inmune del hospedador tendrían un elevado coste para la replicación del virus, generándose variantes más susceptibles de ser eliminadas por el sistema inmune. Además, este tipo de inmunógenos modifican las jerarquías de inmunodominancia observadas en la infección por VIH-1 y en las vacunas que codifican antígenos virales nativos, ya que dirigen la respuesta de las células T a regiones que son subdominantes y poco inmunogénicas en el contexto de la proteína completa.

El nuevo inmunógeno TMEP-B ha sido introducido en un vector de ADN (ADN-TMEP) y también expresado desde MVA (MVA-TMEP) para en ambos casos ensayarlo en protocolos heterólogos combinado con MVA-B. Ambos vectores han sido caracterizados *in vitro* y evaluados *in vivo* de forma comparativa con el sistema homólogo MVA-B/MVA-B que representa el protocolo empleado en clínica. El uso de una primera dosis o "prime" con ADN-TMEP seguido de una dosis refuerzo o "boost" con MVA-B indujo respuestas de células T CD8 específicas frente al VIH-1 significativamente superiores, con un reconocimiento de epítomos más amplio y un perfil polifuncional mayor que la combinación homóloga MVA-B/MVA-B. Además, también se detectaron respuestas más elevadas de células T CD4 y T cooperadoras foliculares (Tfh) específicas frente al VIH-1 usando este régimen (75). Del mismo modo, la combinación ADN-TMEP/MVA-TMEP también fue significativamente superior a la combinación MVA-B/MVA-B expandiendo de forma eficiente la respuesta específica frente al antígeno Gag (76). Estos resultados, aunque aún preliminares, demuestran un cambio en el patrón de inmunodominancia estimulado por MVA-B, expandiendo la respuesta específica frente a epítomos funcionalmente relacionados con protección frente a la infección. Actualmente estamos involucrados en desarrollar vectores de ARNm que producen la proteína TMEP-B para su posterior evaluación como plataforma alternativa a los vectores de ADN y para ensayarlos en combinación con los vectores recombinantes basados en MVA.

Otro factor limitante del vector MVA-B es que expresa la proteína gp120 de la envuelta del VIH-1 en forma monomérica y, por lo tanto, logrando estimular solamente anticuerpos que neutralizan el aislado autólogo.

Durante la última década, la implementación de técnicas de aislamiento, cultivo y clonación de células B individuales aplicada a muestras infectadas por VIH-1 ha permitido la identificación de una nueva generación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bNAbs) que reconocen un gran número de cepas del VIH-1 con gran potencia. Estos anticuerpos, presentes en un porcentaje muy bajo de pacientes (1%), se desarrollan después de varios años de infección (2-4 años) y requieren extensos procesos de hipermutación somática. Su descubrimiento ha abierto nuevas vías para la investigación básica en inmunología, biología estructural y vacunología. Gracias a ellos se ha podido avanzar enormemente en el diseño de proteínas de la envuelta que adopten estructuras triméricas con una conformación similar a la envuelta "nativa" expresada en la partícula viral.

En este sentido, también estamos trabajando en el desarrollo de nuevos vectores recombinantes basados en MVA que expresen distintas formas de la proteína trimérica gp140 del VIH-1 con capacidad para inducir anticuerpos de amplio espectro de acción frente al VIH-1 en modelos animales. En una primera aproximación hemos generado vectores recombinantes que expresan la proteína trimérica gp145 anclada a membrana sola (MVA-gp145), o conjuntamente con la poliproteína GPN que fue optimizada para sufrir procesamiento proteolítico y liberar partículas similares a virus (VLPs) inducidas por Gag (MVA-gp145-GPN). Estos vectores son capaces de expresar la proteína gp145 en la membrana de las células infectadas y exponer epítomos críticos que son reconocidos por un amplio panel de bNAbs, indicando una conformación similar a la nativa. Además, en el doble recombinante la proteína de la envuelta también se incorpora en las VLPs inducidas por Gag. En estudios *in vivo* ambos recombinantes administrados en sistema homólogo generan respuestas de células T específicas frente al VIH-1 y activan células B específicas frente a Env del centro germinal que correlacionan con altos niveles de anticuerpos de unión específicos frente a Env (77). Los próximos pasos con estas construcciones implican su evaluación en conejos para poder determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos que logran inducir.

Estos nuevos estudios en los que estamos implicados, junto con otros dirigidos a la eliminación de los reservorios virales en personas infectadas y financiados por la Unión Europea, proyectos HIVA-CAR y EHVA, nos permitirán definir con qué antígeno optimizado y con qué régimen de inmunización procederemos en un futuro para conseguir respuestas celulares y humorales óptimas que nos permitan controlar la infección por VIH. La lucha contra el VIH es una prioridad sanitaria en la que están implicados muchos países, entre ellos España, y constituye una gran satisfacción personal poder colaborar estrechamente con los mejores equipos de investigación mundiales, destacando la perseverancia que nos debe de conducir a alcanzar ese logro final de la eliminación de uno de los virus con mayor tasa de mortalidad global.

5. REFERENCIAS

1. Moss B. Poxviridae: the viruses and their replication. 4ª ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; 2001. 1249-83 p.
2. Moss B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*. 2006;344(1):48-54.
3. Blasco R, Moss B. Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J. Virol.* 1991;65(11):5910-20.
4. Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93(21):11341-8.
5. Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other or-

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 -60



- thopoxviruses. *Virology*. 1998;244(2):365-96.
6. Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*. 1992;188(1):217-32.
 7. Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol*. 1998;79 (Pt 2):347-52.
 8. Nájera JL, Gómez CE, Domingo-Gil E, Gherardi MM, Esteban M. Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J. Virol.*. 2006;80(12):6033-47.
 9. Sancho MC, Schleich S, Griffiths G, Krijnse-Locker J. The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J Virol*. 2002;76(16):8318-34.
 10. Gallego-Gómez JC, Risco C, Rodríguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, et al. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYC8H) of vaccinia virus in infected human cells. *J. Virol*. 2003;77(19):10606-22.
 11. Guerra S, Nájera JL, González JM, López-Fernández LA, Climent N, Gatell JM, et al. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J. Virol*. 2007;81(16):8707-21.
 12. Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, Johnson GP, Limbach K, Norton EK, et al. Vaccinia virus host range genes. *Virology*. 1990;179(1):276-86.
 13. Oguiura N, Spohner D, Drillien R. Detection of a protein encoded by the vaccinia virus C7L open reading frame and study of its effect on virus multiplication in different cell lines. *J. Gen. Virol*. 1993;74 (Pt 7):1409-13.
 14. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. 2011;3(6):920-40.
 15. Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel QG, Le Roy D, Knaup Raymond M, Akira S, et al. Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathogens*. 2009;5(6):e1000480.
 16. Smith GL, Law M. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res*. 2004;106(2):189-97.
 17. Sadikot RT, Blackwell TS. Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(6):537-40, 11-2.
 18. Perdiguer B, Gómez CE, Esteban M. Bioluminescence Imaging as a Tool for Poxvirus Biology. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2019;2023:269-85.
 19. Gómez CE, Nájera JL, Domingo-Gil E, Ochoa-Callejero L, González-Aseguinolaza G, Esteban M. Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J. gen- Virol*. 2007;88(Pt 9):2473-8.
 20. Corbett M, Bogers WM, Heeney JL, Gerber S, Genin C, Didierlaurent A, et al. Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(6):2046-51.
 21. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(3):153-60.
 22. Excler JL, Kim JH. Novel prime-boost vaccine strategies against HIV-1. *Expert Rev. Vaccines*. 2019;18(8):765-79.
 23. Li S, Rodrigues M, Rodríguez D, Rodríguez JR, Esteban M, Palese P, et al. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8 + T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90(11):5214-8.
 24. Gómez CE, Nájera JL, Jiménez EP, Jiménez V, Wagner R, Graf M, et al. Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine*. 2007;25(15):2863-85.
 25. Gómez CE, Nájera JL, Jiménez V, Bieler K, Wild J, Kostic L, et al. Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine*. 2007;25(11):1969-92.
 26. Reimann KA, Li JT, Voss G, Lekutis C, Tenner-Racz K, Racz P, et al. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J. Virol*. 1996;70(5):3198-206.
 27. Mooij P, Balla-Jhagjhoorsingh SS, Koopman G, Beenhakker N, van Haafden P, Baak I, et al. Differential CD4 + versus CD8 + T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J. Virol*. 2008;82(6):2975-88.
 28. Gómez CE, Perdiguer B, Nájera JL, Sorzano CO, Jiménez V, González-Sanz R, et al. Removal of vaccinia virus genes that block interferon type I and II pathways improves adaptive and memory responses of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C in mice. *J. Virol*. 2012;86(9):5026-38.
 29. Delaloye J, Filali-Mouhim A, Cameron MJ, Haddad EK, Harari A, Goulet JP, et al. Interleukin-1- and type I interferon-dependent enhanced immunogenicity of an NYVAC-HIV-1 Env-Gag-Pol-Nef vaccine vector with dual deletions of type I and type II interferon-binding proteins. *J. Virol*. 2015;89(7):3819-32.
 30. Gómez CE, Perdiguer B, Sánchez-Corzo C, Sorzano COS, Esteban M. Immune Modulation of NYVAC-Based HIV Vaccines by Combined Deletion of Viral Genes that Act on Several Signalling Pathways. *Viruses*. 2017;10(1).
 31. Perdiguer B, Gómez CE, Di Pilato M, Sorzano CO, Delaloye J, Roger T, et al. Deletion of the vaccinia virus gene A46R, encoding for an inhibitor of TLR signalling, is an effective approach to enhance the immunogenicity in mice of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C. *PLoS one*. 2013;8(9):e74831.
 32. Di Pilato M, Mejías-Pérez E, Zonca M, Perdiguer B, Gómez CE, Trakala M, et al. NFκB activation by modified vaccinia virus as a novel strategy to enhance neutrophil migration and HIV-specific T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(11):E1333-42.
 33. García-Arriaza J, Nájera JL, Gómez CE, Tewabe N, Sorzano CO, Calandra



- T, et al. A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses. *PloS one*. 2011;6(8):e24244.
34. Perdiguero B, Gómez CE, Nájera JL, Sorzano CO, Delaloye J, González-Sanz R, et al. Deletion of the viral anti-apoptotic gene F1L in the HIV/AIDS vaccine candidate MVA-C enhances immune responses against HIV-1 antigens. *PloS one*. 2012;7(10):e48524.
35. Falivene J, Del Medico Zajac MP, Pascutti MF, Rodríguez AM, Maeto C, Perdiguero B, et al. Improving the MVA vaccine potential by deleting the viral gene coding for the IL-18 binding protein. *PloS one*. 2012;7(2):e32220.
36. García-Arriaza J, Gómez CE, Sorzano CO, Esteban M. Deletion of the vaccinia virus N2L gene encoding an inhibitor of IRF3 improves the immunogenicity of modified vaccinia virus Ankara expressing HIV-1 antigens. *J. Virol.* 2014;88(6):3392-410.
37. García-Arriaza J, Nájera JL, Gómez CE, Sorzano CO, Esteban M. Immunogenic profiling in mice of a HIV/AIDS vaccine candidate (MVA-B) expressing four HIV-1 antigens and potentiation by specific gene deletions. *PloS one*. 2010;5(8):e12395.
38. García-Arriaza J, Arnaez P, Gómez CE, Sorzano CO, Esteban M. Improving Adaptive and Memory Immune Responses of an HIV/AIDS Vaccine Candidate MVA-B by Deletion of Vaccinia Virus Genes (C6L and K7R) Blocking Interferon Signaling Pathways. *PloS one*. 2013;8(6):e66894.
39. Nájera JL, Gómez CE, García-Arriaza J, Sorzano CO, Esteban M. Insertion of vaccinia virus C7L host range gene into NYVAC-B genome potentiates immune responses against HIV-1 antigens. *PloS one*. 2010;5(6):e11406.
40. Kibler KV, Gómez CE, Perdiguero B, Wong S, Huynh T, Holeczek S, et al. Improved NYVAC-based vaccine vectors. *PloS one*. 2011;6(11):e25674.
41. Quakkelaar ED, Redeker A, Haddad EK, Harari A, McCaughey SM, Duhon T, et al. Improved innate and adaptive immunostimulation by genetically modified HIV-1 protein expressing NYVAC vectors. *PloS one*. 2011;6(2):e16819.
42. Gómez CE, Nájera JL, Sánchez R, Jiménez V, Esteban M. Multimeric soluble CD40 ligand (sCD40L) efficiently enhances HIV specific cellular immune responses during DNA prime and boost with attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC expressing HIV antigens. *Vaccine*. 2009;27(24):3165-74.
43. Moutaftsi M, Salek-Ardakani S, Croft M, Peters B, Sidney J, Grey H, et al. Correlates of protection efficacy induced by vaccinia virus-specific CD8 + T-cell epitopes in the murine intranasal challenge model. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):717-22.
44. Di Pilato M, Mejías-Pérez E, Gómez CE, Perdiguero B, Sorzano CO, Esteban M. New vaccinia virus promoter as a potential candidate for future vaccines. *J. Gen. Virol.* 2013;94(Pt 12):2771-6.
45. Di Pilato M, Sánchez-Sampedro L, Mejías-Pérez E, Sorzano CO, Esteban M. Modification of promoter spacer length in vaccinia virus as a strategy to control the antigen expression. *J. Gen. Virol.* 2015;96(8):2360-71
46. Hulot SL, Korber B, Giorgi EE, Vandergriff N, Saunders KO, Balachandran H, et al. Comparison of Immunogenicity in Rhesus Macaques of Transmitted-Founder, HIV-1 Group M Consensus, and Trivalent Mosaic Envelope Vaccines Formulated as a DNA Prime, NYVAC, and Envelope Protein Boost. *J. Virol.* 2015;89(12):6462-80.
47. Perdiguero B, Gómez CE, Cepeda V, Sánchez-Sampedro L, García-Arriaza J, Mejías-Pérez E, et al. Virological and immunological characterization of novel NYVAC-based HIV/AIDS vaccine candidates expressing clade C trimeric soluble gp140(ZM96) and Gag(ZM96)-Pol-Nef(CN54) as virus-like particles. *J. Virol.* 2015;89(2):970-88.
48. Pantaleo G, Janes H, Karuna S, Grant S, Ouedraogo GL, Allen M, et al. Safety and immunogenicity of a multivalent HIV vaccine comprising envelope protein with either DNA or NYVAC vectors (HVTN 096): a phase 1b, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet HIV*. 2019.
49. Gómez CE, Nájera JL, Krupa M, Esteban M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gen. Ther.* 2008;8(2):97-120.
50. Gómez CE, Nájera JL, Krupa M, Perdiguero B, Esteban M. MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr. Gen. Ther.* 2011;11(3):189-217
51. Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M. Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain. *Expert review of vaccines*. 2013;12(12):1395-416.
52. Harmon TM, Fisher KA, McGlynn MG, Stover J, Warren MJ, Teng Y, et al. Exploring the Potential Health Impact and Cost-Effectiveness of AIDS Vaccine within a Comprehensive HIV/AIDS Response in Low- and Middle-Income Countries. *PloS one*. 2016;11(1):e0146387.
53. de Montigny S, Adamson BJS, Masse BR, Garrison LP, Jr., Kublin JG, Gilbert PB, et al. Projected effectiveness and added value of HIV vaccination campaigns in South Africa: A modeling study. *Sci Rep*. 2018;8(1):6066.
54. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*. 2009;361(23):2209-20.
55. Kim JH, Excler JL, Michael NL. Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu Rev Med*. 2015;66:423-37.
56. Lin L, Finak G, Ushey K, Seshadri C, Hawn TR, Frahm N, et al. COMPASS identifies T-cell subsets correlated with clinical outcomes. *Nat Biotechnol*. 2015;33(6):610-6.
57. Altenburg AF, van de Sandt CE, Li BWS, MacLoughlin RJ, Fouchier RAM, van Amerongen G, et al. Modified Vaccinia Virus Ankara Preferentially Targets Antigen Presenting Cells In Vitro, Ex Vivo and In Vivo. *Sci Rep*. 2017;7(1):8580.
58. Guerra S, González JM, Climent N, Reyburn H, López-Fernández LA, Nájera JL, et al. Selective induction of host genes by MVA-B, a candidate vaccine against HIV/AIDS. *J. Virol.* 2010;84(16):8141-52.
59. Gómez CE, Perdiguero B, Jiménez V, Filali-Mouhim A, Ghneim K, Haddad EK, et al. Systems analysis of MVA-C induced immune response reveals its significance as a vaccine candidate against HIV/AIDS of clade C. *PloS one*. 2012;7(4):e35485.
60. Climent N, Guerra S, García F, Rovira C, Miralles L, Gómez CE, et al. Den-

MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.

Carmen Elena Gómez Rodríguez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 -60



- dratic cells exposed to MVA-based HIV-1 vaccine induce highly functional HIV-1-specific CD8(+) T cell responses in HIV-1-infected individuals. *PLoS one*. 2011;6(5):e19644.
61. García F, Bernaldo de Quiros JC, Gómez CE, Perdiguero B, Nájera JL, Jiménez V, et al. Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02). *Vaccine*. 2011;29(46):8309-16.
62. Gómez CE, Nájera JL, Perdiguero B, García-Arriaza J, Sorzano CO, Jiménez V, et al. The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J. Virol*. 2011;85(21):11468-78.
63. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med*. 2004;10(8):806-10.
64. Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, Coyne-Johnson L, et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*. 2011;473(7348):523-7.
65. Goepfert PA, Elizaga ML, Sato A, Qin L, Cardinali M, Hay CM, et al. Phase I safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J Infect Dis*. 2011;203(5):610-9.
66. Goepfert PA, Elizaga ML, Seaton K, Tomaras GD, Montefiori DC, Sato A, et al. Specificity and 6-month durability of immune responses induced by DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J Infect Dis*. 2014;210(1):99-110.
- 67 Guardo AC, Gómez CE, Díaz-Brito V, Pich J, Arnaiz JA, Perdiguero B, et al. Correction: Safety and vaccine-induced HIV-1 immune responses in healthy volunteers following a late MVA-B boost 4 years after the last immunization. *PLoS one*. 2018;13(4):e0195915.
68. García-Arriaza J, Arnaez P, Jiménez JL, Gómez CE, Muñoz-Fernández MA, Esteban M. Vector replication and expression of HIV-1 antigens by the HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B is not affected by HIV-1 protease inhibitors. *Virus Res*. 2012;167(2):391-6.
69. Mothe B, Climent N, Plana M, Rosas M, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MA, et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia Ankara-based HIV-1 vaccine (MVA-B) in HIV-1-infected patients alone or in combination with a drug to reactivate latent HIV-1. *J. Antimicrob. Ther*. 2015;70(6):1833-42.
70. Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Cepeda V, Sánchez-Sorzano CO, Mothe B, et al. A Phase I Randomized Therapeutic MVA-B Vaccination Improves the Magnitude and Quality of the T Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Subjects on HAART. *PLoS one*. 2015;10(11):e0141456.
71. Rallon N, Mothe B, López Bernaldo de Quiros JC, Plana M, Ligos JM, Montoya M, et al. Balance between activation and regulation of HIV-specific CD8+ T-cell response after modified vaccinia Ankara B therapeutic vaccination. *AIDS*. 2016;30(4):553-62.
72. Hurst J, Hoffmann M, Pace M, Williams JP, Thornhill J, Hamlyn E, et al. Immunological biomarkers predict HIV-1 viral rebound after treatment interruption. *Nat Commun*. 2015;6:8495.
73. Rosas-Umbert M, Mothe B, Noguera-Julian M, Bellido R, Puertas MC, Carrillo J, et al. Virological and immunological outcome of treatment interruption in HIV-1-infected subjects vaccinated with MVA-B. *PLoS one*. 2017;12(9):e0184929.
74. Neidich SD, Fong Y, Li SS, Geraghty DE, Williamson BD, Young WC, et al. Antibody Fc effector functions and IgG3 associate with decreased HIV-1 risk. *J Clin Invest*. 2019.
75. Perdiguero B, Raman SC, Sánchez-Corzo C, Sorzano COS, Valverde JR, Esteban M, et al. Potent HIV-1-Specific CD8 T Cell Responses Induced in Mice after Priming with a Multiepitopic DNA-TMEP and Boosting with the HIV Vaccine MVA-B. *Viruses*. 2018;10(8).
76. Perdiguero B, Sánchez-Corzo C, CO SS, Mediavilla P, Saiz L, Esteban M, et al. Induction of Broad and Polyfunctional HIV-1-Specific T Cell Responses by the Multiepitopic Protein TMEP-B Vected by MVA Virus. *Vaccines*. 2019;7(3).
77. Perdiguero B, Sánchez-Corzo C, Sorzano COS, Saiz L, Mediavilla P, Esteban M, et al. A Novel MVA-Based HIV Vaccine Candidate (MVA-gp145-GPN) Co-Expressing Clade C Membrane-Bound Trimeric gp145 Env and Gag-Induced Virus-Like Particles (VLPs) Triggered Broad and Multifunctional HIV-1-Specific T Cell and Antibody Responses. *Viruses*. 2019;11(2).
78. Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*. 1990;179(1):247-66, 517-63.

6. DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en la presente revisión.

Si desea citar nuestro artículo:
MVA-B como candidato vacunal frente al VIH/SIDA: de la investigación básica a los ensayos clínicos profiláctico y terapéutico.
Carmen Elena Gómez Rodríguez
An Real Acad Farm (Internet).
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 29 -60

RECEPTOR MINERALOCORTICOIDE EXTRARRENAL. UNA POSIBLE NUEVA DIANA PARA COMBATIR EL DAÑO VASCULAR

EXTRARENAL MINERALOCORTICOID RECEPTOR. A POTENTIAL NEW TARGET AGAINST VASCULAR DAMAGE

Ana M. Briones y Raquel Rodríguez-Díez¹

¹Departamento de Farmacología, Instituto de Investigación Hospital La Paz, Universidad Autónoma de Madrid. Ciber Cardiovascular.

*corresponding author: ana.briones@uam.es

Sent: February 1, 2020 | Reviewed: March 1, 2020 | Accepted: March 15, 2020. | Language of Manuscript: Spanish

anranf.2020.86.

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 61 -73

ORIGINAL

RESUMEN

El receptor mineralocorticoide (MR) y su principal ligando la aldosterona juegan un papel fundamental en la regulación de la presión arterial a través de sus efectos facilitadores de la reabsorción de sodio y agua. Los antagonistas del receptor de la aldosterona son fármacos de probada eficacia, que en la actualidad se utilizan en pacientes seleccionados con hipertensión arterial resistente. Además, estos fármacos aumentan la supervivencia en diversas circunstancias como en la insuficiencia cardiaca, proporcionan protección renal en pacientes con enfermedad renal crónica y tienen efectos beneficiosos adicionales en otras patologías. Más allá de sus efectos cardiorrenales, en la actualidad sabemos que el MR se expresa en otros tejidos como células musculares lisas y endoteliales vasculares mediando efectos deletéreos tales como remodelado vascular, rigidez vascular y disfunción endotelial, los cuales son factores pronósticos de futuros eventos cardiovasculares. Además, nuevas evidencias experimentales demuestran que el MR se expresa también en células adyacentes a la vasculatura como células inmunes y adipocitos a través de los cuales podría influir en la función y estructura vascular. Entre los mecanismos responsables de dichos efectos se incluyen mecanismos genómicos y no genómicos, que facilitan la producción de especies reactivas de oxígeno de distintas fuentes, entre las que destaca la enzima NADPH oxidasa, así como de otros mediadores inflamatorios. En este artículo se revisan las evidencias experimentales y clínicas que sugieren que la activación del MR por aldosterona es un importante mediador de daño vascular a través de la producción de especies reactivas de oxígeno.

ABSTRACT

Mineralocorticoid receptor (MR) and its main ligand aldosterone, play a key role in the regulation of blood pressure through their effects increasing sodium and water reabsorption. MR antagonists are effective drugs that are currently used in selected patients with resistant hypertension. In addition, these drugs increase patients survival in specific circumstances such as heart failure, they offer renal protection in chronic kidney disease patients and they have beneficial effects in other pathologies. Besides MR cardiorenal effects, it is now accepted that MR is expressed in other tissues and cells such as vascular smooth muscle cells and endothelial cells where excessive MR activation induces deleterious effects such as vascular remodeling and stiffness and endothelial dysfunction, which are prognostic factors for future cardiovascular events. Moreover, novel evidence demonstrate that MR is also expressed in non-vascular cells adjacent to vessels such as immune cells and adipocytes that might influence vascular function and structure. Among the mechanisms responsible for these effects of MR are genomic and non genomic mechanisms that facilitate reactive oxygen species production mainly from the NADPH oxidase enzyme, as well as production of other inflammatory mediators. Here we review the experimental and clinical evidence that suggest that MR activation by aldosterone is an important mediator of vascular damage through the production of reactive oxygen species.

Palabras Clave:

aldosterona
receptor mineralocorticoide
estrés oxidativo
disfunción endotelial
remodelado vascular

Keywords:

aldosterone
mineralocorticoid receptor
oxidative stress
endothelial dysfunction
vascular remodeling.

1. INTRODUCCIÓN

El receptor mineralocorticoide (MR) es el receptor principal de la hormona aldosterona, la cual regula en el riñón la retención de sodio y agua modulando así la homeostasis iónica y el volumen sanguíneo y, por tanto, la presión arterial. El MR, cuya localización se pensó originariamente que era exclusiva del riñón, se encuentra expresado en multitud de tejidos extra-renales y es funcionalmente activo en los sistemas cardiovascular, inmune y tejido adiposo. La excesiva activación del MR está implicada en varias enfermedades cardiovasculares (1,2) y en los últimos años, se le ha implicado también en enfermedades metabólicas y en la resistencia a insulina. A nivel vascular, el MR se expresa en células endoteliales y células musculares lisas y su activación da lugar a remodelado vascular, fibrosis y disfunción endotelial, lo cual produce daño vascular, rigidez vascular e hipertensión arterial (1-3). El MR también se expresa en células no vasculares pero en contacto directo con la pared vascular, como las procedentes del sistema inmune y los adipocitos mediando diversos procesos inflamatorios y metabólicos (4,5).

El MR es un receptor intracelular que tiene tres dominios:

un dominio N-terminal que controla la actividad transcripcional del receptor; el dominio de unión al DNA que influye en la unión de elementos específicos de respuesta a la región promotora de los genes diana del MR y finalmente, el dominio de unión al ligando para aldosterona. Tras la activación, el MR se transloca al núcleo y regula la transcripción génica y la traducción de proteínas, mediante la unión en el DNA a elementos de respuesta estimulantes o represores de la síntesis de hormonas/esteroides (1,2). Además, aldosterona produce efectos no genómicos rápidos mediados por mecanismos dependientes e independientes del MR (6) y estudios recientes han puesto en evidencia que la supresión de la expresión de miRNAs dependiente de MR ocasiona la sobreexpresión vascular de las dianas de dichos miRNAs (7). Tanto los efectos genómicos como los no genómicos promueven la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente por la enzima NADPH oxidasa, así como inflamación y fibrosis, las cuales intervienen en el remodelado y rigidez vascular así como en la disfunción endotelial. Esta revisión se centra en la relación entre la aldosterona, el receptor mineralocorticoide y el estrés oxidativo así como en los efectos vasculares de dicha relación (Figura 1).

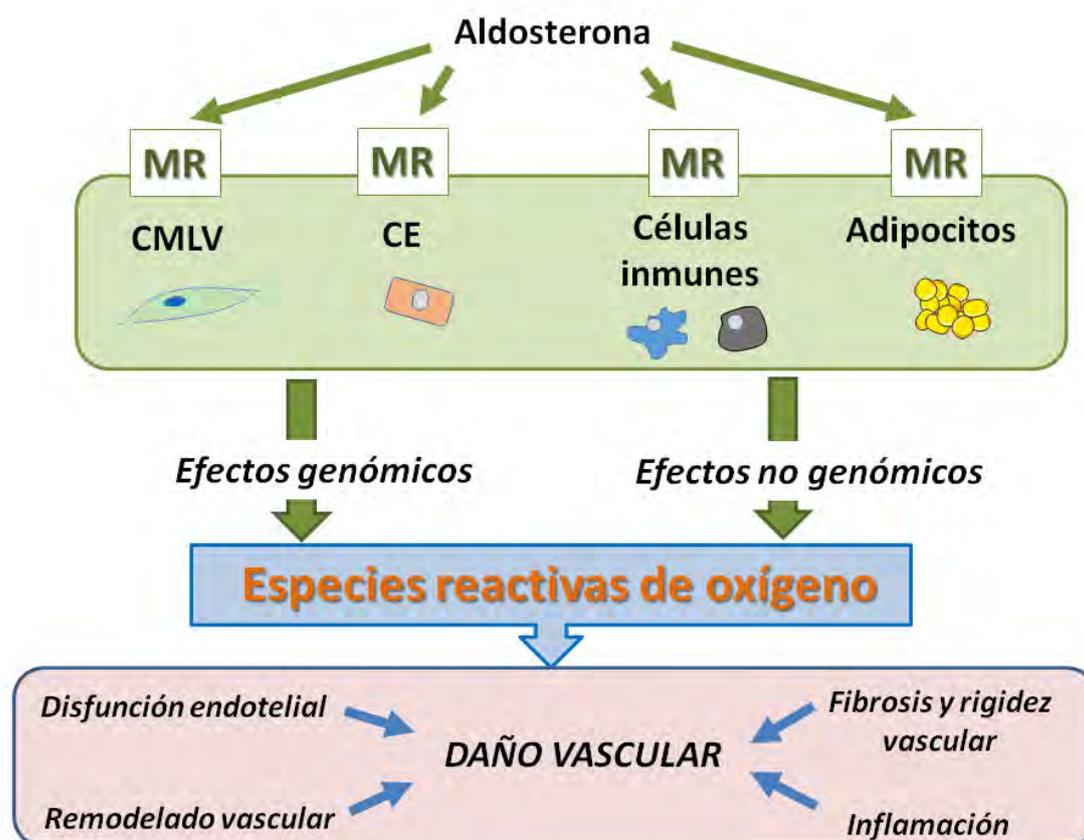


Figura 1. Papel del receptor mineralocorticoide en el daño vascular. A nivel vascular, el receptor mineralocorticoide (MR) se expresa en células endoteliales y vasculares lisas. También se localiza en adipocitos y células inmunes que pueden rodear o infiltrarse en el vaso. La activación del MR a través de mecanismos genómicos y no genómicos da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno, que favorecen la disfunción endotelial, el remodelado, fibrosis y rigidez vascular así como inflamación crónica de bajo grado. Todos estos factores producen daño vascular que favorecen o contribuyen al desarrollo y/o mantenimiento de la hipertensión arterial y otras enfermedades cardiovasculares. CE: Célula endotelial; CMLV: Célula muscular lisa vascular



2. PAPEL DEL RECEPTOR MINERALOCORTICOIDE EN LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS VASCULARES

Numerosas evidencias demuestran que existe una relación entre el MR y la señalización redox en células vasculares. En modelos animales como el obtenido tras la administración de acetato de deoxicorticosterona (DOCA) y sal o de aldosterona y sal, con o sin nefrectomía, se observa un incremento en el estrés oxidativo vascular.

Además, tanto en modelos experimentales como en humanos, los fármacos bloqueantes del MR reducen los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) en patologías cardiovasculares como la hipertensión, obesidad, aterosclerosis o insuficiencia cardíaca, si bien existen ciertas diferencias entre los diversos estudios que bien podrían ser explicadas por una deficiente o no adecuada medida de dichas ROS, lo cual constituye un importante desafío en la actualidad (8,9).

En células musculares lisas vasculares (CMLV) (10-15) y células endoteliales (16-21) en cultivo, la exposición a aldosterona incrementa la producción de ROS. Además, la infusión de aldosterona en roedores incrementa el estrés oxidativo plasmático y vascular y el bloqueo del receptor MR reduce la producción de ROS en el contexto de la hipertensión, la obesidad y otras enfermedades cardiovasculares (21-29). Estudios iniciales identificaron a la enzima NADPH oxidasa como la responsable de la incrementada producción de ROS vasculares, específicamente de anión superóxido (O_2^-), en aorta de ratas con hipertensión inducida por mineralocorticoides, excluyendo otras fuentes de ROS vasculares (por ejemplo, la eNOS desacoplada, o la xantina oxidasa) como potenciales contribuyentes (30). De hecho, la NADPH oxidasa se considera la principal fuente productora de ROS en respuesta a aldosterona y activación de MR en vasos.

La familia de la NADPH oxidasa o Nox está compuesta de 7 isoformas que incluyen las Nox1-5 y las Duox1 y 2, varias subunidades regulatorias (p22phox, p47phox, Noxo1, p67phox, Noxa1, p40phox) y el principal factor de unión Rac. La principal función catalítica de las NADPH oxidasas es la generación de ROS y lo hacen reduciendo el oxígeno a O_2^- siendo NADPH el donador de electrones. Nox2 es la Nox clásica que fue inicialmente caracterizada en leucocitos. Asimismo, Nox-1, Nox-2, Nox-4 y Nox-5 se expresan en el sistema cardiovascular y, es importante mencionar que Nox5 no se expresa en roedores, lo cual dificulta enormemente su estudio. En relación con la especie oxidante que producen cada una de las isoformas, Nox1, Nox2, Nox3 y Nox5 producen O_2^- mientras que Nox4 y las Duox producen H_2O_2 (31, 32). En las arterias, las células vasculares poseen Noxs funcionales pero además, los macrófagos residentes, los neutrófilos y las plaquetas también expresan NADPH oxidasas, particularmente en situaciones patológicas, que pueden contribuir al daño vascular en diversas patologías (32, 33).

2.1. Mecanismos implicados en la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a aldosterona y estimulación del MR

En la actualidad, se conoce que el receptor MR puede producir varios de sus efectos a través de efectos genómicos y no genómicos, y la producción de ROS es uno de dichos efectos (Figura 1). Así, diferentes estudios han mostrado modulación de las Nox por aldosterona/MR. Concretamente, a nivel vascular, la combinación de aldosterona y sal produce un aumento en la producción de O_2^- en CMLV a través de la sobreexpresión de Nox1 sin afectar al mRNA de Nox4, p22phox o p47phox (11). En células endoteliales de vena umbilical humana, aldosterona aumentó la transcripción de p47phox pero no tuvo efecto en los transcritos de Nox1, Nox2, Nox4, p22phox, p40phox, o p67phox (16). Sin embargo, otros estudios mostraron que la incubación con aldosterona durante 24 h incrementó de manera dependiente de la dosis la expresión del mRNA de Nox4 en dichas células endoteliales humanas (17). En células endoteliales pulmonares humanas, aldosterona incrementó los niveles de proteína de Nox4 y p22phox así como la producción de H_2O_2 (20). De manera similar, en células endoteliales de retina bovina, aldosterona incrementó la expresión del gen de Nox4 (19) y otro estudio mostró que la administración de aldosterona moduló exclusivamente la expresión del gen de p22phox en células endoteliales aórticas (21). En estudios in vivo se ha observado que la administración de aldosterona más sal a ratas incrementó la actividad de la NADPH oxidasa y la expresión de p47phox, gp91phox y p22phox (34). Más recientemente, Jia y cols (29) encontraron una incrementada expresión vascular de Nox2 y de nitrotirosina (un marcador de estrés nitrosativo) después de 3 semanas de infusión de aldosterona en ratones. Todos estos resultados claramente sugieren un patrón de sobre-expresión de NADPH oxidasa por aldosterona a nivel vascular, lo cual es además apoyado por el hecho de que antagonistas del MR disminuyen la expresión de distintas subunidades de la NADPH oxidasa (9). Por ejemplo, el tratamiento con eplerenona disminuyó la expresión de p22phox, p47phox y p40phox en un modelo de dieta alta en grasa (21). Además, la eliminación del MR en distintos tipos de células vasculares específicos disminuye la expresión de las isoformas de la NADPH oxidasa (ampliado más abajo).

En lo que respecta a la activación no genómica rápida del MR por aldosterona, se ha sugerido que MR podría estar localizado cerca de la membrana plasmática pero no directamente insertado en ella. El MR se localizaría en el lado citosólico asociado a proteínas de anclaje que están asociadas a la membrana o insertadas en ella como estriatina o caveolina-1 (6). En esta localización, aldosterona podría interactuar con receptores con actividad tirosina quinasa tales como el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o el receptor para el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1R), así

Receptor mineralocorticoide extrarrenal. Una posible nueva diana para combatir el daño vascular.

Ana M. Briones y Raquel Rodríguez-Díez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 61-73

como con receptores acoplados a proteínas G (GPCR), tales como el receptor AT1 de angiotensina II o el receptor 1 de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER1) (6). La familia Src de proteínas con actividad tirosin quinasa parece estar implicada en la generación no genómica de ROS inducida por aldosterona (9). Concretamente, en CMLV en cultivo, la generación de ROS a través de NADPH oxidasa mediada por los efectos no genómicos de aldosterona está aumentada en células de ratas espontáneamente hipertensas y es dependiente de c-Src (10). También se ha descrito un papel para c-Src y Rac-1 en la activación de NADPH oxidasa en células endoteliales, aunque este efecto podría estar mediado por vías genómicas ya que se analizaron los efectos de la incubación con aldosterona durante tiempos prolongados (18). En CMLV, la transactivación de EGFR y PDGFR pero no de IGFR, inducida por MR y AT1 activa c-Src que a su vez, facilita la activación de la NADPH oxidasa y la producción de ROS lo que produce migración de CMLV (35).

Además de los receptores acoplados a tirosin quinasa, los GPCR son importantes compañeros implicados en las acciones no genómicas de aldosterona. Así, la interacción entre el MR y el AT1 se ha implicado en la producción de ROS inducida por angiotensina II en vasos ya que el bloqueo del MR puede inhibir dicha producción (22). Más recientemente, se ha mostrado que el subtipo AT1a es necesario

para la disfunción endotelial, remodelado vascular, estrés oxidativo e inflamación inducidos por la activación del MR (27), aunque un efecto genómico no puede ser del todo descartado en estos estudios. En miocitos cardiacos, la interacción entre el MR y el AT1 participa en la generación de ROS inducida por aldosterona mediada por Nox4 a través de la quinasa 2 de receptores acoplados a proteínas G (GRK2) probablemente a través de acciones no genómicas (36), aunque si este mecanismo dependiente de GRK2 también ocurre en células vasculares no se conoce. Igualmente, no es conocido el papel del posible nuevo receptor de aldosterona GPER1 (también conocido como GPR30) en la producción de ROS inducida por aldosterona en células vasculares y las evidencias que apoyan esta posibilidad provienen de células cardiacas (37,38).

Finalmente, es importante destacar que la señalización no genómica del MR también puede modular los efectos genómicos (6) perpetuando así la generación de ROS en células vasculares.

2.2. Ruta aldosterona/MR/estrés oxidativo en células endoteliales y musculares lisas

Numerosas evidencias experimentales han demostrado un efecto beneficioso del bloqueo de la ruta aldosterona/MR en el daño vascular, concretamente en la disfunción endotelial, remodelado y ri-

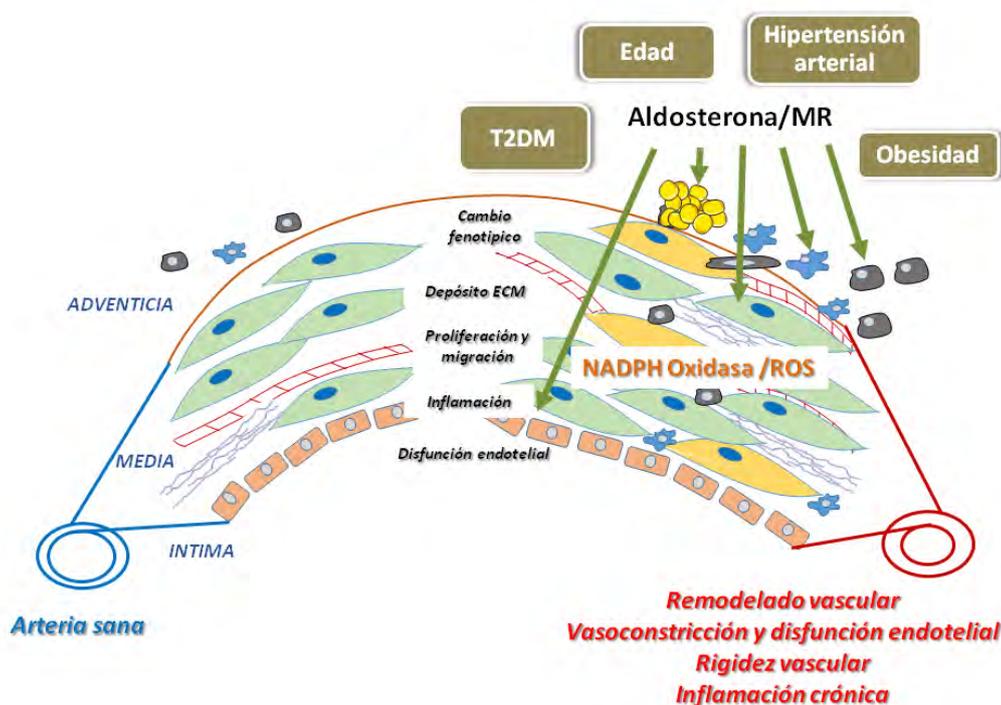


Figura 2. Implicación del receptor mineralocorticoide en el daño vascular en situaciones patológicas. En condiciones patológicas como la diabetes tipo 2 (T2DM), la edad, la hipertensión arterial o la obesidad, la excesiva producción de aldosterona y/o activación del receptor MR en los distintos tipos de células vasculares, en los adipocitos o en células inflamatorias infiltradas, produce la activación de la enzima NADPH oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos mediadores afectan a la función de dichos tipos celulares produciendo cambios fenotípicos y la proliferación y migración de células musculares lisas, la excesiva producción de matriz extracelular y de citoquinas inflamatorias. Estos eventos contribuyen al remodelado y rigidez vascular, la disfunción endotelial y al estado inflamatorio característicos de muchas de estas enfermedades.



gidez vasculares, así como en el estrés oxidativo (1-3,21,22,39-42). Por tanto, se ha sugerido que muchos de los efectos beneficiosos de los antagonistas de MR podrían deberse, al menos en parte, a su habilidad para disminuir el estrés oxidativo. Esto se apoya también en evidencias directas que proceden de estudios utilizando modelos de infusión de aldosterona o mineralocorticoides junto con tratamientos antioxidantes o por el uso de modelos transgénicos de ratón que sobre-expresan o no expresan el MR.

MR se expresa en células endoteliales de arterias cerebrales donde produce un aumento en la producción de O_2^- en respuesta a niveles crónicamente aumentados de aldosterona (26). Además, la expresión del mRNA de p22phox, pero no de gp91phox, se incrementó por aldosterona, siendo este efecto completamente bloqueado en ratones con delección de MR específicamente en células endoteliales, lo cual se acompañó además de una mejoría en la función endotelial (21). Sin embargo, en ausencia de estímulos, la sobre-expresión condicional de MR en células endoteliales no es suficiente para incrementar los niveles locales o sistémicos de estrés oxidativo (43), lo que sugiere que la sobreexpresión de MR solo no es suficiente para producir un aumento en la generación de ROS. Este hallazgo coincide con la idea de que el MR de las células endoteliales podría ser vasoprotector en estados fisiológicos y que dicha protección se pierde cuando coexisten factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión u obesidad o situaciones asociadas a elevados niveles de aldosterona, como se ha sugerido recientemente (2,44) (Figura 2). En apoyo de esta hipótesis, la deficiencia del MR específicamente en células endoteliales previno el aumento en la expresión de Nox2, Nox4, p22phox y 3-nitrotirosina inducidos por una dieta tipo *western* y esto fue paralelo a una reducción en la fibrosis aórtica y la rigidez, así como con la normalización de la activación de la eNOS (28). Igualmente, la eliminación de MR en células endoteliales previno en arterias de resistencia, la disfunción endotelial asociada a la hiperlipidemia en hembras, pero no en machos, y esto se asoció a una menor producción de O_2^- (45).

En lo que respecta a CMLV, aunque los ratones con delección específica de MR en CMLV no muestran cambios en los niveles basales de ROS, dichos ratones cuando envejecen producen significativamente menos ROS (7,46). Además, tanto los ratones jóvenes como los envejecidos que no expresan MR en CMLV muestran una atenuada producción de ROS inducida por angiotensina II (46), lo cual podría contribuir a la menor presión arterial que muestran esos animales y a la mejor función vascular (46). Más recientemente, una relación inversa entre el receptor MR de CMLV y el miR-155 se ha descrito en el envejecimiento (7), relación por la cual este miRNA produciría una represión del estrés oxidativo asociado a MR de CML, lo cual tendría un efecto también en la función vascular (7). Sin embargo, la fuente de ROS específica que sería modulada por el miR-155 es desconocida. El MR de CML también se ha implicado en la progresión de la insuficiencia car-

diaca post-infarto de miocardio a través de su efecto directo induciendo estrés oxidativo, que favorece la disfunción endotelial y una disminución en la reserva coronaria (47). Así, en este estudio, los antioxidantes apocinina y superóxido dismutasa (SOD), mejoraron la relajación dependiente de endotelio de arterias coronarias de ratones con infarto de miocardio sin afectar a la relajación de las arterias de ratones *knockout* para MR específicos de CMLV de ratones con infarto ni a las arterias de ratones con infarto tratados con el antagonista del MR finerenona (47), hallazgos que indican un menor efecto del estrés oxidativo cuando el MR está ausente en CMLV o después de un bloqueo general del MR. Todos juntos, estos resultados apuntan a las células endoteliales y las CMLV como fuentes potenciales de ROS en respuesta a aldosterona o condiciones patológicas que impactan sobre la función vascular (Figura 2).

Respecto al papel del estrés oxidativo en el remodelado y la rigidez vascular, se ha demostrado que la administración de una combinación de aldosterona y sal produjo un aumento en la producción de O_2^- e hipertrofia de las CMLV a través de la sobreexpresión de Nox1 (11). Asimismo, diferentes antioxidantes atenuaron la senescencia inducida por aldosterona de CMLV y la expresión del factor proliferativo Ki-ras2A (48). Además, se ha sugerido que aldosterona aumenta los efectos hipertróficos vasculares de la insulina a través de rutas mediadas por MR y estrés oxidativo (49). Igualmente, la hipertrofia y la fibrosis perivasculares inducidas por aldosterona, se disminuyeron significativamente por el tratamiento a largo plazo con espirolactona o antioxidantes (50, 51). Sin embargo, los efectos profibróticos pero no las acciones hipertróficas de aldosterona en arterias de resistencia fueron bloqueados por el antioxidante tempol (23). Los mecanismos responsables de estos efectos posiblemente radican en la capacidad de los ROS producidas por aldosterona para modular diversos genes implicados en el daño vascular, tales como el factor de crecimiento de plaquetas, las metalotioninas 1 y 2 o el factor de crecimiento del tejido conectivo (52). Además, aldosterona incrementó la expresión de los factores profibróticos fibronectina y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en ratones de fenotipo salvaje pero no en ratones knockout para Nox1 (53,62) (Figura 2). Finalmente, el tratamiento con el antioxidante tempol inhibió la expresión de otros marcadores proinflamatorios y profibróticos tales como osteopontina, la molécula de adhesión intracelular 1, la molécula de adhesión celular vascular 1 o la expresión del gen de PAI-1 inducidos por la infusión de aldosterona en ratas (54).

Entre los mecanismos responsables de la disfunción endotelial, generalmente se asume que la interacción entre NO y O_2^- , generalmente procedente de la NADPH oxidasa, da lugar a la formación de ONOO- o al desacoplamiento de eNOS, lo cual facilita una disminución en la disponibilidad de NO, entre otros mecanismos (revisado extensamente en 31-33,55,56). En este escenario, la aldosterona pro-



dujo una inhibición de la producción de NO en células endoteliales que fue parcialmente restaurada por la delección de la subunidad p47phox utilizando un siRNA (16). Otros potenciales mecanismos responsables de la disfunción endotelial inducida por la ruta aldosterona/MR/ROS incluyen: 1) modificaciones postraduccionales oxidativas de la actividad de la guanilato ciclasa, que empeora la capacidad de responder de esta enzima ante el NO (12); 2) disminución en la expresión de la enzima antioxidante Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (57) o 3) modificaciones oxidativas de los grupos tiol de las cisteínas funcionales (Cys405) en el receptor B para endotelina (ETBR), por mecanismos que dependen de la producción de H_2O_2 de Nox4, que empeoran la activación dependiente de dicho receptor y la consiguiente activación de la eNOS lo que disminuye la producción de NO (20). En este sentido, la activación del MR durante la isquemia renal induce activación de Rac1, que incrementa la producción de ROS en las CMLV, los cuales difunden a las células endoteliales para inducir modificaciones postraduccionales en el ETBR que empeora la activación de la eNOS y disminuye la producción de NO, dando lugar a una sostenida vasoconstricción y reducida perfusión del riñón (58). Además, la sobreexpresión específica en cardiomiocitos del receptor humano MR induce severa disfunción endotelial coronaria con disminuida respuesta relajadora mediada por NO en respuesta a acetilcolina en arterias coronarias, efectos que fueron prevenidos por un mes de tratamiento con un antagonista del MR, con vitamina E/vitamina C o con un inhibidor de la NADPH oxidasa (59). Finalmente, también se ha descrito un papel del canal de sodio epitelial en el efecto de aldosterona incrementando el estrés oxidativo, la rigidez vascular, la disfunción endotelial y la fibrosis (29). Curiosamente, Rac1 no es solo uno de los componentes de la NADPH oxidasa, sino que sirve para aumentar la señalización del MR en el riñón (60). Esta ruta Rac1-MR se activa por ROS en cardiomiocitos (61) y también juega un papel crucial en la producción de ROS y la disfunción cardíaca (62).

3. PAPEL DEL MR COMO PRODUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS INMUNES

Evidencias cada vez más abundantes sugieren que aldosterona induce infiltración vascular de monocitos/macrófagos y células T en diferentes situaciones patológicas (24,63,64). El MR se expresa en macrófagos y linfocitos T donde funciona como un importante regulador transcripcional del fenotipo celular y de la función y que puede ser activado incluso con niveles normales o bajos de aldosterona en situaciones patológicas (5,65) (Figuras 1 y 2).

La relación entre las células inmunes, el MR y el estrés oxidativo fue demostrada en ratas uninefrectomizadas y tratadas durante 4 semanas con un 1% de NaCl en la dieta junto con aldosterona. En estas ratas se encontró una incrementada producción de H_2O_2 por mo-

nocitos y linfocitos, una sobreexpresión de la tirosina fosfatasa inducida por estrés oxidativo y de la Mn-SOD en células periféricas mononucleares y la presencia del marcador de estrés oxidativo 3-nitrotirosina en células inflamatorias CD4+ invadiendo arterias coronarias intramurales (66). Asimismo, Guzik y cols (67) mostraron que la hipertensión inducida por DOCA/sal y la producción de $O_2^{\cdot-}$ asociada en la aorta se abolieron en ratones deficientes en rag-/- que no poseen linfocitos T y B. Además, una aumentada cantidad de linfocitos T reguladores, que son supresores de las respuestas inmunes innatas y adaptativas, previnieron la disfunción endotelial, el remodelado vascular y el estrés oxidativo inducidos por aldosterona (25). Más recientemente, el papel clave del MR en células inmunes en la generación de estrés oxidativo fue demostrada por Sun y cols (68), que mostraron que arterias de ratones knockout para MR específicamente en células T, mostraban menor producción de $O_2^{\cdot-}$, lo cual además se correlacionó con un menor daño de órgano diana incluyendo mejor función endotelial y menos hipertrofia vascular y fibrosis después de la infusión con angiotensina II.

Esto podría ser debido a una menor producción de células T productoras de $IFN-\gamma$ en las arterias (68). De hecho, el receptor MR de las células T facilita la activación de dichas células modulando la producción de citoquinas proinflamatorias tales como $IFN-\gamma$ e IL-6 (69), las cuales es bien conocido que pueden producir producción de ROS a nivel vascular.

Respecto a los macrófagos, se ha demostrado que la estimulación de macrófagos con aldosterona induce un fenotipo proinflamatorio M1 (5). Macrófagos procedentes de ratones que no poseen MR en células mieloides exhiben un perfil transcripcional de activación alternativa de un fenotipo M1 hacia un fenotipo M2 más antiinflamatorio (70). Esto podría modular la función vascular, ya que se ha demostrado que el inflammasoma NLRP3 en macrófagos media la hipercontractilidad inducida por aldosterona, la disfunción endotelial y el remodelado hipertrófico (71), aunque en este estudio la contribución específica de las ROS derivadas de los macrófagos no fue específicamente evaluada. Curiosamente, un desplazamiento en la polarización a un fenotipo M2 en los macrófagos se observó en ratones con delección específica del MR en células endoteliales cuando fueron expuestos a una dieta de tipo *western* (28), lo que sugiere un papel del MR endotelial en la función de los macrófagos. Al respecto del estrés oxidativo, aldosterona incrementa la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la activación de la NADPH oxidasa en macrófagos tanto in vivo como in vitro (72) y también la generación de ROS mitocondriales (71), que podrían contribuir a la activación del inflammasoma en este tipo celular como se ha sugerido previamente (73). Lo que es más importante, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular inducidos por aldosterona estaban disminuidos en ratones *mcsfOp/+*, los cuales poseen un bajo número de monocitos/macrófagos en la pared vascular (24), lo que sugiere que la activación del MR en macrófagos modula el estrés oxidativo vascular.



Curiosamente, el estrés oxidativo medido en este caso como expresión génica de las subunidades Nox2 y p22phox se incrementó de manera similar en el corazón de los ratones control y de ratones con deleción específica de MR en macrófagos cuando se expusieron a una combinación del inhibidor de NOS L-NAME y sal, como modelo de hipertensión (74). Asimismo, la deficiencia de MR en macrófagos no influyó en el estado oxidativo en el contexto de la aterosclerosis (75). En conjunto, estos resultados sugieren una contribución diferente de las ROS derivadas de MR en distintas situaciones patológicas. Otros estudios in vivo demostraron que la deficiencia de MR en macrófagos imitó los efectos de los antagonistas del MR y protegió contra el daño vascular causado por L-NAME/angiotensina II (70) y que la eliminación selectiva del MR en células mieloides limitó la acumulación de macrófagos, lo cual dio lugar a menor activación de las CML e inflamación vascular inhibiendo la hiperplasia de la neoíntima y el remodelado vascular (76). Desgraciadamente, en ambos estudios, de nuevo la contribución específica de los ROS derivados de macrófagos no fue evaluada.

En conjunto, todos estos resultados apuntan a una contribución clave del MR presente en células inmunes en la producción de estrés oxidativo en el contexto de daño vascular (Figura 2). Si dicha contribución es debida a ROS producidos localmente por células inmunes infiltradas o a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias que afectarían a las CML o células endoteliales adyacentes para inducir estrés oxidativo, o ambos mecanismos, es de momento desconocido.

4. PAPEL DEL MR COMO PRODUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO

Otro tejido extrarrenal que expresa el MR es el tejido adiposo donde el MR está implicado en procesos esenciales tales como la diferenciación, la autofagia o la secreción de adipoquinas (4,77). La expresión del MR se incrementa en el tejido adiposo de modelos murinos de obesidad y en sujetos humanos obesos y, diferentes estudios utilizando antagonistas del MR o modelos transgénicos con deleción específica del MR en adipocitos, han demostrado un papel clave del MR en la señalización de la insulina y la inflamación (revisado en 4,77,78). Está bien aceptado que el tejido adiposo, particularmente el tejido adiposo perivascular, modula la salud vascular y la enfermedad a través de la liberación de diversas adipoquinas, que afectan a las propiedades contráctiles y relajadoras del vaso, a la proliferación e hipertrofia de las CML, a la fibrosis y la inflamación (79). Entre las muchas sustancias liberadas, ROS como H₂O₂ parecen tener un papel principal tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Sin embargo, en algunas situaciones patológicas, tales como obesidad o hipertensión, citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 o TNF- α , liberadas de este tejido adiposo perivascular, claramente afectan al tono vascular (79) debido, al menos en parte, a un incremento en la generación de ROS. Así, en ar-

terias mesentéricas de animales sanos, las propiedades anticontráctiles del tejido adiposo perivascular se pierden después de la incubación con aldosterona, propiedades que se restauran con una combinación de los antioxidantes SOD y catalasa y con el antagonista del MR eplerenona, siendo este efecto dependiente de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo perivascular (80). Además, en la línea celular 3T3-L1 de adipocitos, el bloqueo del MR reduce la producción de ROS (81,82).

Estudios iniciales demostraron que las subunidades de la NADPH oxidasa p22 y p47phox estaban significativamente aumentadas en tejido adiposo de ratones obesos ob/ob y db/db comparados con sus controles delgados y que el tratamiento con eplerenona suprimió este incremento (81). El aumento en los niveles de ROS observados en tejido adiposo de estos modelos de obesidad podría ser también debido a una disminución en la expresión génica de las enzimas eliminadoras de ROS catalasa y Cu, Zn-SOD que se encontraban reducidas tanto en los ratones ob/ob como en los db/db y que también fueron restauradas por la administración de eplerenona (81). Otros estudios también demostraron sobreexpresión de enzimas antioxidantes (SOD-1 y catalasa) a nivel vascular tras el bloqueo del MR en obesidad/diabetes (41). Finalmente, en el tejido adiposo de ratas nefrectomizadas, el estrés oxidativo estaba aumentado y esto se revirtió tras el tratamiento con otro antagonista del MR, espirolactona (83).

La sobreexpresión condicional del MR en adipocitos murinos dio lugar a una incrementada producción de H₂O₂ del tejido adiposo epididimal probablemente debido a una disminución en la expresión del gen de la catalasa y un aumento en la expresión de los niveles de Nox4 sin cambios en las expresiones de Nox1 o Nox2, hallazgos que probablemente explican los cambios en la contractilidad vascular encontrados en este modelo (84). Curiosamente, ratones knockout para MR específicos de adipocitos cuando se alimentaron con una dieta alta en grasa y en sacarosa, mostraron niveles similares del marcador de estrés oxidativo 8-isoprostano, o de los genes de p22phox, SOD-1 o catalasa, y además, no mostraron diferencias en el peso corporal, peso de la grasa, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina o inflamación (85). Resultados similares han sido publicados recientemente por Feraco y cols (86) utilizando un modelo de deleción inducible de MR específica de adipocitos cuando se les alimentó con una dieta alta en grasa (45 %), aunque es importante destacar que en este estudio el estrés oxidativo no fue evaluado. En este contexto, son necesarios estudios futuros para identificar la contribución específica del MR en los diferentes tipos celulares incluidos en el tejido adiposo además de los adipocitos, como preadipocitos o macrófagos y su función como posibles responsables de la inflamación, estrés oxidativo y alteraciones metabólicas dependientes del MR asociadas a la obesidad (Figura 2).



5. RELEVANCIA CLÍNICA DE LA RUTA ALDOSTERONA/MR/ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha discutido en las secciones anteriores, existe una importante cantidad de evidencia preclínica que demuestra que la ruta aldosterona/MR señala a través de estrés oxidativo. Sin embargo, las evidencias en humanos son menos abundantes. Algunos estudios clínicos han sugerido que el hiperaldosteronismo está asociado con una elevada concentración de marcadores circulantes de estrés oxidativo. Así, en pacientes con insuficiencia cardíaca estable y en pacientes con hipertensión, niveles elevados de aldosterona se asociaron con elevados niveles de estrés oxidativo sistémico, inflamación y recambio de matriz extracelular (87). En pacientes con insuficiencia cardíaca, el daño cardiovascular asociado a la aldosterona y la fibrosis renal estaban asociadas a una producción de NO disminuida, incrementado estrés oxidativo y activación de factores de transcripción proinflamatorios como NF- κ B (9). A nivel celular, existen también algunas evidencias que demuestran que aldosterona estimula la producción de ROS en humanos. Así, en células endoteliales humanas, espirolactona inhibió el estrés oxidativo dependiente de Nox e incrementó la actividad de la eNOS (88), indicando un papel del MR en la regulación de la producción de ROS. En pacientes con hiperaldosteronismo y adenomas adrenales, diversos estudios han mostrado incrementada expresión de genes y proteínas relacionados con la señalización redox como el factor de transcripción antioxidante Nrf2, p22phox, la enzima antioxidante hemoxygenasa-1 o factores de transcripción proinflamatorios (89-91).

Además, en cardiomiocitos humanos, aldosterona empeora la función mitocondrial que es importante en la regulación redox (91). A pesar de las evidencias que sugieren que el hiperaldosteronismo promueve estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular humana, los estudios existentes utilizando antagonistas del MR, no han mostrado una mejoría significativa en marcadores de estrés oxidativo. Así, Hwang y cols (92) demostraron que la mejoría en la dilatación mediada por flujo (una medida de función endotelial) inducida por eplerenona, no se asociaba con marcadores de estrés oxidativo como los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos, o con la expresión proteica de nitrotirosina o p47phox en células vasculares endoteliales. En un grupo pequeño de adultos ancianos con síndrome metabólico, la dilatación dependiente de endotelio mediada por flujo, los niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas o los F2-isoprostanos, no mejoraron en respuesta al bloqueo del MR, a pesar de observarse una reducción en la presión arterial sistólica de unos 10 mm Hg (93). Además, no hubo efecto del tratamiento durante un mes con eplerenona en el estrés oxidativo (LDL oxidadas) y en la rigidez vascular en adultos ancianos sanos (94). Sin embargo, Chen y cols (95) demostraron recientemente que el aumentado estrés oxidativo dependiente de NADPH oxidasa, la degradación oxidativa del cofactor de la eNOS tetrahidrobiopterina, el desacoplamiento de la eNOS y la reducida generación de NO, eran

los responsables de la empeorada capacidad de reparación endotelial in vivo de células progenitoras endoteliales tempranas de pacientes hipertensos con hiperaldosteronismo primario (95). Las razones de estas discrepancias entre estudios preclínicos y clínicos no son claras, pero podrían incluir la existencia de poblaciones heterogéneas con un prolongado periodo de enfermedad, diferencias en las medidas de los marcadores de estrés oxidativo o la evaluación de grupos pequeños de pacientes. Son necesarios, por tanto, estudios clínicos bien controlados para confirmar el papel de las ROS en el daño cardiovascular mediado por aldosterona y, en este contexto, son imprescindibles ensayos clínicos que determinen los efectos de los antagonistas del MR en los niveles de ROS específicas, en lugar de marcadores de estrés oxidativo como LDL oxidadas o F2-2 isoprostanos. En cualquier caso, no debemos olvidar que los antagonistas del receptor de la aldosterona son fármacos de probada eficacia, que en la actualidad se usan en pacientes seleccionados con hipertensión arterial resistente (96). Además, estos compuestos proporcionan un aumento en la supervivencia en diversas circunstancias como la insuficiencia cardíaca y posiblemente, proporcionan protección renal en pacientes con enfermedad renal crónica, así como efectos beneficiosos adicionales en otras patologías (97). En base a lo presentado en este artículo, es posible hipotetizar que parte de los efectos beneficiosos de estos compuestos, podrían ser debidos a sus efectos sobre la señalización redox y la mejora del daño cardiovascular.

6. CONCLUSIONES

Las evidencias experimentales muestran claramente que el bloqueo de la ruta aldosterona/MR disminuye el estrés oxidativo vascular y mejora la función, estructura y propiedades mecánicas vasculares alteradas en distintos modelos experimentales. Entre los tipos celulares vasculares implicados en el daño vascular asociado a aldosterona/MR/estrés oxidativo están las células endoteliales y las células musculares lisas. Sin embargo, evidencias cada vez más abundantes sugieren que estos efectos vasculares pueden ser modulados también por el MR expresado en células inmunes infiltradas, como linfocitos y macrófagos, y en el tejido adiposo perivascular que rodea al vaso, células que podrían liberar ROS que impacten en el endotelio y la pared vascular. Alternativamente, estas células pueden generar citoquinas inflamatorias (o adipoquinas) dependientes de MR que actúan de manera paracrina en los vasos adyacentes para inducir estrés oxidativo pudiendo dañar el vaso. Así, el estrés oxidativo asociado a la activación del MR en distintos tipos celulares emerge como una importante ruta que contribuye a la disfunción vascular y al daño asociado a condiciones de elevados niveles de aldosterona o de activación del MR. Por ello, es posible que algunos de los efectos vasoprotectores de los antagonistas del MR, utilizados en la clínica, pueden ser debidos a la inhibición del daño vascular producido por el estrés oxidativo.

Receptor mineralocorticoide extrarrenal. Una posible nueva diana para combatir el daño vascular.

Ana M. Briones y Raquel Rodríguez-Díez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 61 -73



7. LISTA DE ABREVIATURAS

- AT1: receptor 1 para angiotensina II
 CMLV: células musculares lisas vasculares
 DOCA: acetato de deoxicorticosterona
 ETBR: receptor B para endotelina
 GPCR: receptores acoplados a proteínas G
 GPER1: receptor 1 de estrógenos acoplado a proteínas G
 GRK2: quinasa 2 de receptores acoplados a proteínas G
 IGF1R: receptor para el factor de crecimiento similar a insulina 1
 MR: receptor mineralocorticoide
 Nox: NADPH oxidasa
 PDGFR: receptor para el factor decrecimiento derivado de plaquetas
 ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés reactive oxygen species
 SOD: superóxido dismutasa
 T2DM: diabetes mellitus tipo 2

8. AGRADECIMIENTOS

AMB está financiada por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-80305P), Instituto de Salud Carlos III (PI13/01488; CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CB16/11/00286) y Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3676), Fondo Social Europeo (FSE), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a way to build Europe. RR-D está financiada por un contrato Juan de la Cierva Reincorporación ((IJC1-2017-31399).

9. REFERENCIAS

- Jaisser F, Farman N. Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2016; 68(1):49-75.
- DuPont JJ, Jaffe IZ. 30 years of the mineralocorticoid receptor: The role of the mineralocorticoid receptor in the vasculature. *J Endocrinol.* 2017; 234(1):T67-T82.
- Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res.* 2013; 50(2):89-99.
- Armani A, Marzolla V, Fabbri A, Caprio M. Cellular mechanisms of MR regulation of adipose tissue physiology and pathophysiology. *J Mol Endocrinol.* 2015; 55(2):R1-10.
- van der Heijden CDCC, Deinum J, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. The mineralocorticoid receptor as a modulator of innate immunity and atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2018; 114(7):944-953.
- Ruhs S, Nolze A, Hübschmann R, Grossmann C. 30 years of the mineralocorticoid receptor: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinol.* 2017; 234(1):T107-T124.
- DuPont JJ, McCurley A, Davel AP, McCarthy J, Bender SB, Hong K, Yang Y, Yoo JK, Aronovitz M, Baur WE, Christou DD, Hill MA, Jaffe IZ. Vascular mineralocorticoid receptor regulates microRNA-155 to promote vasoconstriction and rising blood pressure with aging. *JCI Insight.* 2016; 1(14):e88942.
- Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, Harrison DG, Bhatnagar A; American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res.* 2016; 119(5):e39-75.
- Queisser N, Schupp N. Aldosterone, oxidative stress, and NF- κ B activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(2):314-27.
- Callera GE, Montezano AC, Yagi A, Tostes RC, He Y, Schiffrin EL, Touyz RM. c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2005; 46(4):1032-8.
- Fan C, Kawai Y, Inaba S, Arakawa K, Katsuyama M, Kajinami K, Yasuda T, Yabe-Nishimura C, Konoshita T, Miyamori I. Synergy of aldosterone and high salt induces vascular smooth muscle hypertrophy through up-regulation of NOX1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 111(1-2):29-36.
- Maron BA, Zhang YY, Handy DE, Beuve A, Tang SS, Loscalzo J, Leopold JA. Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2009; 284(12):7665-72.
- Fu Y, Shi G, Wu Y, Kawai Y, Tian Q, Yue L, Xia Q, Miyamori I, Fan C. The mitochondria mediate the induction of NOX1 gene expression by aldosterone in an ATF-1-dependent manner. *Cell Mol Biol Lett.* 2011; 16(2):226-35.
- Muehlfelder M, Arias-Loza PA, Fritzscheier KH, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, ER α and ER β , prevent aldosterone-induced oxidative stress in VSMC via increased NADPH bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(4):850-6.
- Zhang X, Liu J, Pang X, Zhao J, Wang S, Wu D. Aldosterone induces C-reactive protein expression via MR-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 395(1-2):61-8.
- Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, Hirata Y, Naruse M. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension.* 2006; 48(1):165-71.
- Hashikabe Y, Suzuki K, Jojima T, Uchida K, Hattori Y. Aldosterone impairs vascular endothelial cell function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47(4):609-13.
- Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirono Y, Hirata Y. Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology.* 2008; 149(3):1009-14.
- Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Miller AG. Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circ Res.* 2009; 104(1):124-

Receptor mineralocorticoide extrarrenal. Una posible nueva diana para combatir el daño vascular.

Ana M. Briones y Raquel Rodríguez-Díez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 61-73



- 33.
20. Maron BA, Zhang YY, White K, Chan SY, Handy DE, Mahoney CE, Loscalzo J, Leopold JA. Aldosterone inactivates the endothelin-B receptor via a cysteinyl thiol redox switch to decrease pulmonary endothelial nitric oxide levels and modulate pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2012; 126(8):963-74.
21. Schäfer N, Lohmann C, Winnik S, van Tits LJ, Miranda MX, Vergopoulos A, Ruschitzka F, Nussberger J, Berger S, Lüscher TF, Verrey F, Matter CM. Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *Eur Heart J*. 2013; 34(45):3515-24.
22. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*. 2002; 40(4):504-10.
23. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2004; 17(7):597-603.
24. Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 2009; 27(11):2192-200.
25. Kasal DA, Barhoumi T, Li MW, Yamamoto N, Zdanovich E, Rehman A, Neves MF, Laurant P, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 2012; 59(2):324-30.
26. Dinh QN, Young MJ, Evans MA, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Aldosterone-induced oxidative stress and inflammation in the brain are mediated by the endothelial cell mineralocorticoid receptor. *Brain Res*. 2016; 1637:146-153.
27. Briet M, Barhoumi T, Mian MOR, Coelho SC, Ouerd S, Rautureau Y, Coffman TM, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone-Induced Vascular Remodeling and Endothelial Dysfunction Require Functional Angiotensin Type 1a Receptors. *Hypertension*. 2016; 67(5):897-905.
28. Jia G, Habibi J, Aroor AR, Martinez-Lemus LA, DeMarco VG, Ramirez-Pérez FI, Sun Z, Hayden MR, Meininger GA, Mueller KB, Jaffe IZ, Sowers JR. Endothelial Mineralocorticoid Receptor Mediates Diet-Induced Aortic Stiffness in Females. *Circ Res*. 2016; 118(6):935-943.
29. Jia G, Habibi J, Aroor AR, Hill MA, Yang Y, Whaley-Connell A, Jaisser F, Sowers JR. Epithelial Sodium Channel in Aldosterone-Induced Endothelium Stiffness and Aortic Dysfunction. *Hypertension*. 2018; 72(3):731-738.
30. Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*. 2001; 38(5):1107-11.
31. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012; 110(10):1364-90.
32. Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(10):1110-20.
33. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res*. 2011; 34(1):5-14.
34. Park YM, Lim BH, Touyz RM, Park JB. Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. *J Korean Med Sci*. 2008; 23(6):1039-45.
35. Montezano AC, Callera GE, Yogi A, He Y, Tostes RC, He G, Schiffrin EL, Touyz RM. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(8):1511-8.
36. Cannavo A, Liccardo D, Eguchi A, Elliott KJ, Traynham CJ, Ibetti J, Eguchi S, Leosco D, Ferrara N, Rengo G, Koch WJ. Myocardial pathology induced by aldosterone is dependent on non-canonical activities of G protein-coupled receptor kinases. *Nat Commun*. 2017; 7:10877.
37. De Giusti VC, Orłowski A, Ciancio MC, Espejo MS, Gonano LA, Caldiz CI, Vila Petroff MG, Villa-Abrille MC, Aiello EA. Aldosterone stimulates the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter via activation of the g protein-coupled receptor gpr30. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 89(Pt B):260-7.
38. Ashton AW, Le TY, Gómez-Sánchez CE, Morel-Kopp MC, McWhinney B, Hudson A, Mihailidou AS. Role of Nongenomic Signaling Pathways Activated by Aldosterone During Cardiac Reperfusion Injury. *Mol Endocrinol*. 2015; 29(8):1144-55.
39. Sanz-Rosa D1, Oubiña MP, Cediell E, De las Heras N, Aragoncillo P, Balfagón G, Cachafeiro V, Lahera V. Eplerenone reduces oxidative stress and enhances eNOS in SHR: vascular functional and structural consequences. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(9-10):1294-301.
40. Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C. Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J*. 2008; 29(17):2171-9.
41. Silva MA, Bruder-Nascimento T, Cau SB, Lopes RA, Mestriner FL, Fais RS, Touyz RM, Tostes RC. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Front Physiol*. 2015; 6:269.
42. Silva MA, Cau SB, Lopes RA, Manzato CP, Neves KB, Bruder-Nascimento T, Mestriner FL, Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM, Tostes RC. Mineralocorticoid receptor blockade prevents vascular remodelling in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 129(7):533-45.
43. Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbil V, Loufrani L, Labat C, Benjamin L, Farman N, Lacolley P, Henrion D, Jaisser F. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J*. 2010; 24(7):2454-63.
44. Davel AP, Anwar IJ, Jaffe IZ. The endothelial mineralocorticoid receptor: mediator of the switch from vascular health to disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017; 26(2):97-104.
45. Davel AP, Lu Q, Moss ME, Rao S, Anwar IJ, DuPont JJ, Jaffe IZ. Sex-Specific



- Mechanisms of Resistance Vessel Endothelial Dysfunction Induced by Cardiometabolic Risk Factors. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7(4). pii: e007675.
46. McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, Chambon P, Hill MA, Dorrance AM, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med.* 2012; 18(9):1429-33.
 47. Gueret A, Harouki N, Favre J, Galmiche G, Nicol L, Henry JP, Besnier M, Thuillez C, Richard V, Kolkhof P, Mulder P, Jaisser F, Ouvrard-Pascaud A. Vascular Smooth Muscle Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. *Hypertension.* 2016; 67(4):717-23.
 48. Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Li JM, Sakata A, Fujita T, Tsukuda K, Iwai M, Horiuchi M. Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence. *Cardiovasc Res.* 2007; 76(3):506-16.
 49. Sherajee SJ, Fujita Y, Rafiq K, Nakano D, Mori H, Masaki T, Hara T, Kohno M, Nishiyama A, Hitomi H. Aldosterone induces vascular insulin resistance by increasing insulin-like growth factor-1 receptor and hybrid receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(2):257-63.
 50. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol.* 2002 161(5):1773-81.
 51. Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2005; 28(11):925-36.
 52. Newfell BG, Iyer LK, Mohammad NN, McGraw AP, Ehsan A, Rosano G, Huang PL, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(8):1871-80.
 53. Harvey AP, Montezano AC, Hood KY, Lopes RA, Rios F, Ceravolo G, Graham D, Touyz RM. Vascular dysfunction and fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: The aldosterone-mineralocorticoid receptor-Nox1 axis. *Life Sci.* 2017; 179:110-119.
 54. Hirono Y, Yoshimoto T, Suzuki N, Sugiyama T, Sakurada M, Takai S, Kobayashi N, Shichiri M, Hirata Y. Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: the possible role of local renin-angiotensin system. *Endocrinology.* 2007; 148(4):1688-96.
 55. Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SW. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res.* 2016; 119(2):375-96.
 56. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017; 120(4):713-735.
 57. Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med.* 2007; 13(2):189-97.
 58. Barrera-Chimal J, Prince S, Fadel F, El Moghrabi S, Warnock DG, Kolkhof P, Jaisser F. Sulfenic Acid Modification of Endothelin B Receptor is Responsible for the Benefit of a Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonist in Renal Ischemia. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27(2):398-404.
 59. Favre J, Gao J, Zhang AD, Remy-Jouet I, Ouvrard-Pascaud A, Dautreux B, Escoubet B, Thuillez C, Jaisser F, Richard V. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300(6):H2035-43.
 60. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, Miyoshi J, Takai Y, Fujita T. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med.* 2008; 14(12):1370-6.
 61. Nagase M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Ishizawa K, Ueda K, Yoshida S, Fujita T. Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. *Hypertension.* 2012; 59(2):500-6.
 62. Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T, Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T. Rac1-Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. *Hypertension.* 2016; 67(1):99-106.
 63. McGraw AP, Bagley J, Chen WS, Galayda C, Nickerson H, Armani A, Caprio M, Carmeliet P, Jaffe IZ. Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(1):e000018.
 64. Marzolla V, Armani A, Mammi C, Moss ME, Pagliarini V, Pontecorvo L, Antelmi A, Fabbri A, Rosano G, Jaffe IZ, Caprio M. Essential role of ICAM-1 in aldosterone-induced atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2017; 232:233-242.
 65. Belden Z, Deiluiis JA, Dobre M, Rajagopalan S. The Role of the Mineralocorticoid Receptor in Inflammation: Focus on Kidney and Vasculature. *Am J Nephrol.* 2017; 46(4):298-314.
 66. Ahokas RA, Warrington KJ, Gerling IC, Sun Y, Wodi LA, Herring PA, Lu L, Bhattacharya SK, Postlethwaite AE, Weber KT. Aldosteronism and peripheral blood mononuclear cell activation: a neuroendocrine-immune interface. *Circ Res.* 2003; 93(10):e124-35.
 67. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* 2007; 204(10):2449-60.
 68. Sun XN, Li C, Liu Y, Du LJ, Zeng MR, Zheng XJ, Zhang WC, Liu Y, Zhu M, Kong D, Zhou L, Lu L, Shen ZX, Yi Y, Du L, Qin M, Liu X, Hua Z, Sun S, Yin H, Zhou B, Yu Y, Zhang Z, Duan SZ. T-Cell Mineralocorticoid Receptor Controls Blood Pressure by Regulating Interferon-Gamma. *Circ Res.* 2017; 120(10):1584-1597.

Receptor mineralocorticoide extrarrenal. Una posible nueva diana para combatir el daño vascular.

Ana M. Briones y Raquel Rodríguez-Díez

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 61 -73



69. Li C, Sun XN, Zeng MR, Zheng XJ, Zhang YY, Wan Q, Zhang WC, Shi C, Du LJ, Ai TJ, Liu Y, Liu Y, Du LL, Yi Y, Yu Y, Duan SZ. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in T Cells Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction Through Modulating T-Cell Activation. *Hypertension*. 2017; 70(1):137-147
70. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, Lumeng CN, Mortensen RM. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120(9):3350-64.
71. Bruder-Nascimento T, Ferreira NS, Zanotto CZ, Ramalho F, Pequeno IO, Olivon VC, Neves KB, Alves-Lopes R, Campos E, Silva CA, Fazan R, Carlos D, Mestriner FL, Prado D, Pereira FV, Braga T, Luiz JP, Cau SB, Elias PC, Moreira AC, Câmara NO, Zamboni DS, Alves-Filho JC, Tostes RC. NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage. *Circulation*. 2016; 134(23):1866-1880.
72. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, Aviram M. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*. 2004; 109(18):2213-20.
73. Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Taniguchi S, Takahashi M, Kashiwara N. Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. *FASEB J*. 2015; 29(9):3899-910.
74. Bienvenu LA, Morgan J, Rickard AJ, Tesch GH, Cranston GA, Fletcher EK, Delbridge LM, Young MJ. Macrophage mineralocorticoid receptor signaling plays a key role in aldosterone-independent cardiac fibrosis. *Endocrinology*. 2012; 153(7):3416-25.
75. Shen ZX, Chen XQ, Sun XN, Sun JY, Zhang WC, Zheng XJ, Zhang YY, Shi HJ, Zhang JW, Li C, Wang J, Liu X, Duan SZ. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in Macrophages Inhibits Atherosclerosis by Affecting Foam Cell Formation and Efferocytosis. *J Biol Chem*. 2017; 292(3):925-935.
76. Sun JY, Li C, Shen ZX, Zhang WC, Ai TJ, Du LJ, Zhang YY, Yao GF, Liu Y, Sun S, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Peng Y, Chen M, Liu X, Tao J, Zhou B, Yu Y, Guo F, Du J, Duan SZ. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in Macrophages Inhibits Neointimal Hyperplasia and Suppresses Macrophage Inflammation Through SGK1-AP1/NF- κ B Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36(5):874-85.
77. Jia G, Aroor AR, Sowers JR (2017) The role of mineralocorticoid receptor signaling in the cross-talk between adipose tissue and the vascular wall. *Cardiovasc Res* 113(9):1055-1063.
78. Garg R & Adler GK. Aldosterone and the Mineralocorticoid Receptor: Risk Factors for Cardiometabolic Disorders. *Curr Hypertens Rep*. 2015; 17(7):52.
79. Fernández-Alfonso MS, Somoza B, Tsvetkov D, Kuczmanski A, Dashwood M, Gil-Ortega M. Role of Perivascular Adipose Tissue in Health and Disease. *Compr Physiol*. 2017; 8(1):23-59.
80. Withers SB, Agabiti-Rosei C, Livingstone DM, Little MC, Aslam R, Malik RA, Heagerty AM. Macrophage activation is responsible for loss of anti-contractile function in inflamed perivascular fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(4):908-13.
81. Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Res*. 2009; 84(1):164-72.
82. Hirata A, Maeda N, Nakatsuji H, Hiuge-Shimizu A, Okada T, Funahashi T, Shimomura I. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 419(2):182-7.
83. Hosoya K, Minakuchi H, Wakino S, Fujimura K, Hasegawa K, Komatsu M, Yoshifuji A, Futatsugi K, Shinozuka K, Washida N, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. Insulin resistance in chronic kidney disease is ameliorated by spironolactone in rats and humans. *Kidney Int*. 2015; 87(4):749-60.
84. Nguyen Dinh Cat A, Antunes TT, Callera GE, Sánchez A, Tsiropoulou S, Dulak-Lis MG, Anagnostopoulou A, He Y, Montezano AC, Jaisser F, Touyz RM. Adipocyte-Specific Mineralocorticoid Receptor Overexpression in Mice Is Associated With Metabolic Syndrome and Vascular Dysfunction: Role of Redox-Sensitive PKG-1 and Rho Kinase. *Diabetes*. 2016; 65(8):2392-403.
85. Hayakawa T, Minemura T, Onodera T, Shin J, Okuno Y, Fukuhara A, Otsuki M, Shimomura I. Impact of MR on mature adipocytes in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity. *J Endocrinol*. 2018; 239(1):63-71.
86. Feraco A, Armani A, Urbanet R, Nguyen Dinh Cat A, Marzolla V, Jaisser F, Caprio M. Minor role of mature adipocyte mineralocorticoid receptor in high fat induced obesity. *J Endocrinol*. 2018; Aug 18. pii: JOE-18-0314. doi: 10.1530/JOE-18-0314. (Epub ahead of print)
87. Kotlyar E, Vita JA, Winter MR, Awtry EH, Siwik DA, Keaney JF Jr, Sawyer DB, Cupples LA, Colucci WS, Sam F. The relationship between aldosterone, oxidative stress, and inflammation in chronic, stable human heart failure. *J Card Fail*. 2006; 12(2):122-7.
88. Taye A, Morawietz H. Spironolactone inhibits NADPH oxidase-induced oxidative stress and enhances eNOS in human endothelial cells. *Iran J Pharm Res*. 2011; 10(2):329-37.
89. Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Armanini D, Mormino P, Rossi GP, Pessina AC. Oxidative stress-related proteins in a Conn's adenoma tissue. Relevance for aldosterone's prooxidative and proinflammatory activity. *J Endocrinol Invest*. 2010; 33(1):48-53.
90. Zhou J, Lam B, Neogi SG, Yeo GS, Azizan EA, Brown MJ. Transcriptome Pathway Analysis of Pathological and Physiological Aldosterone-Producing Human Tissues. *Hypertension*. 2016; 68(6):1424-1431.
91. Ibarrola J, Sadaba R, Martínez-Martínez E, García-Peña A, Arrieta V, Alvarez V, Fernández-Celis A, Gainza A, Cachafeiro V, Santamaria E, Fernández-Irigoyen J, Jaisser F, López-Andrés N. Aldosterone Impairs Mitochondrial Function in Human Cardiac Fibroblasts via A-Kinase Anchor



- Protein 12. *Sci Rep.* 2018; 8(1):6801.
92. Hwang MH, Yoo JK, Luttrell M, Kim HK, Meade TH, English M, Segal MS, Christou DD. Mineralocorticoid receptors modulate vascular endothelial function in human obesity. *Clin Sci (Lond).* 2013; 125(11):513-20.
93. Hwang MH, Yoo JK, Luttrell M, Meade TH, English M, Christou DD. Effect of Selective Mineralocorticoid Receptor Blockade on Flow-Mediated Dilation and Insulin Resistance in Older Adults with Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015; 13(8):356-61.
94. Hwang MH, Yoo JK, Luttrell M, Kim HK, Meade TH, English M, Nichols WW, Christou DD. Role of mineralocorticoid receptors in arterial stiffness in human aging. *Exp Gerontol.* 2013; 48(8):701-4.
95. Chen L, Ding ML, Wu F, He W, Li J, Zhang XY, Xie WL, Duan SZ, Xia WH, Tao J. Impaired Endothelial Repair Capacity of Early Endothelial Progenitor Cells in Hypertensive Patients With Primary Hyperaldosteronemia: Role of 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin Oxidation and Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling. *Hypertension.* 2016; 67(2):430-9.
96. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I; ESC Scientific Document Group. Collaborators (182). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018; 39(33):3021-3104.
97. Kolkhof P, Bärfacker L. 30 years of the mineralocorticoid receptor: Mineralocorticoid receptor antagonists: 60 years of research and development. *J Endocrinol.* 2017; 234(1):T125-T140.

10. DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en la presente revisión.

Si desea citar nuestro artículo:
Briones y Rodríguez-Díez
Receptor mineralocorticoide extrarrenal. Una posible nueva diana para combatir el daño vascular.
An Real Acad Farm (Internet).
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 61 -73

PAPEL DEL FARMACÉUTICO EN LA VENTA Y DISTRIBUCIÓN DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

ROLE OF THE PHARMACIST IN THE SALE AND DISTRIBUTION OF VETERINARY DRUGS

Raquel Hidalgo Sanz¹

¹Colegio Oficial de Farmacéuticos de La Rioja

*corresponding author: raquel16196@gmail.com

Sent: February 1, 2020 | Reviewed: March 1, 2020 | Accepted: March 15, 2020. | Language of Manuscript: Spanish

anranf.2020.86.

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 75 - 88

ORIGINAL

RESUMEN

El incremento de animales de compañía y animales productores de alimentos, junto con el importante gasto sanitario que estos suponen, hacen que el sector del medicamento veterinario esté adquiriendo cada vez más peso en España. Ante esta situación, se nos plantea la duda de si los propietarios, veterinarios y especialmente farmacéuticos, estamos correctamente preparados e informados. Tal como se observa en la recopilación de leyes sobre venta y distribución de medicamentos de uso veterinario realizada en este trabajo, actualmente no existe una legislación que se adecúe a las necesidades sanitarias de estos animales pudiendo observar en su aplicación intrusiones por parte del veterinario en las funciones legalmente establecidas y propias del farmacéutico o la venta ilegal de medicamentos veterinarios por parte de establecimientos sin la debida autorización. Por lo que al farmacéutico respecta, la falta de información y formación en este campo se manifiesta en varios aspectos como la falta de atención farmacéutica o la aceptación de recetas indebidamente cumplimentadas por el veterinario. Todo ello incrementa el riesgo de realizar un mal uso de los medicamentos por parte del propietario suponiendo así un peligro no solo para el propio animal, sino también para las personas como ocurre en el caso concreto de los antibióticos. Por tanto, nos encontramos frente a un importante problema de regulación y falta de información entre propietarios y profesionales sanitarios, que hace necesaria la realización de campañas informativas y la formación de farmacéuticos y veterinarios desde los Colegios Oficiales y Universidades.

ABSTRACT

The veterinary medicinal sector is gaining more and more importance in Spain because of the increasing of livestock population and pets, and the significant healthcare costs that they involve. Given this situation, are the owners, veterinarians and especially pharmacists, properly prepared and informed? As it can be seen in the compilation of laws about sale and distribution of veterinary medicaments presented in this work, nowadays there is not a legislation adapted to the health requirements of these animals. Indeed, there are some problems in the application of the law such the intrusion of veterinarians in the own and legally established pharmacist's functions and the illegal sale of veterinary drugs by non properly authorized establishments. Concerning the pharmacist's role, the lack of information and training in this area, is manifested in several aspects such a limited ability of pharmaceutical advice and the admission of prescriptions improperly filled by the veterinarian. Taken together, it increases the risk of abuse or wrong use of drugs by the owner, assuming a real danger not only for the animal itself, but also for the people, as in the case of antibiotics consumption. In conclusion, we are facing a critical problem of law regulation and lack of knowledge between owners and healthcare professionals. Therefore, it would be necessary that Universities and Official Colleges carry out information campaigns and organize specific training to pharmacists and veterinarians.

Palabras Clave:

Medicamento veterinario
Farmacia
Legislación
Prescripción
Mascotas
Antibióticos.

Keywords:

Veterinary drugs
Pharmacy
Legislation
Prescription
Pets
Antibiotics.



1. INTRODUCCIÓN

El mundo veterinario está adquiriendo cada vez más peso en España. Por un lado, con los animales productores de alimentos, de los cuales hay registrados alrededor de 767 millones de cabezas ganaderas, incluyendo aves de corral (1). Y, por otro lado, el creciente número de animales de compañía, unos 13 millones, aunque si tenemos en cuenta todos aquellos que no están registrados, se estima que nos movemos en torno a los 20 millones de mascotas (2). Esto quiere decir que, en al menos el 40 % de hogares en España, hay un animal doméstico que convive estrechamente con el ser humano.

Además del creciente número de animales, nos encontramos frente a un aumento en los cuidados que el propietario proporciona y en el gasto por animal, entre los que se encuentran los cuidados sanitarios. En total, en España se invierten más de 590 millones de euros en medicamentos veterinarios.

Ante esta situación, es evidente que es necesario un control. Por ello nos disponemos a analizar si el marco legal actual es suficiente para realizarlo y si los profesionales implicados (farmacéuticos y veterinarios) estamos suficientemente informados y preparados. También estudiaremos los problemas que aparecen en la aplicación de la normativa existente.

2. MARCO LEGAL

El papel del farmacéutico en la venta y distribución de medicamentos destinados a la salud humana está perfectamente regulado y establecido. Las distintas materias que se cursan a lo largo del plan de estudios del Grado en Farmacia, se encuentran mayoritariamente centradas en salud humana y solo muy colateralmente se hace relación a la venta y distribución de medicamentos destinados a animales.

Sin embargo, el papel del Farmacéutico en la venta y distribución de medicamentos veterinarios (MV) no siempre es claro. Las competencias comunes con otros profesionales sanitarios (especialmente veterinarios), el hecho de que algunos de los animales receptores de medicación vayan a ser fuente de alimentos humanos, el que no existan (o sean muy minoritarias) oficinas de farmacia (OF) específicas para medicamentos veterinarios y que la venta y distribución se puedan realizar por diferentes vías, suponen entre otros, los motivos por los que resulta necesario situarnos en contexto y profundizar en el lugar que ocupa el farmacéutico en el sector del medicamento de uso veterinario.

Por otra parte, no resulta fácil encontrar la legislación que regula la posesión, venta y distribución de los MV: la normativa europea se ha adaptado a las regulaciones de cada estado miembro de la UE y, en España, la transferencia de competencias en materia de sanidad ha supuesto marcos reguladores diferentes para cada Comunidad Autónoma (C.A.).

Además, el sector del MV se caracteriza por determinadas

particularidades. Así, los medicamentos destinados a los animales productores de alimentos de consumo humano solo podrán autorizarse en condiciones que garanticen la inocuidad de estos alimentos para el consumidor en lo que respecta a la posible existencia de residuos de tales medicamentos.

Finalmente, a esta situación hay que añadir las continuas actualizaciones que implican modificaciones en legislaciones vigentes. Este panorama ha supuesto que el trabajo que presento haya tenido que comenzar con una intensiva búsqueda de legislación a diferentes niveles: Unión Europea (3,4), España (5-7) y Comunidades Autónomas (8-12), actualizando las escasas publicaciones existentes sobre el tema (13).

En el capítulo 3, se expone la legislación europea, su adaptación en el Estado Español y las diferencias entre dos Comunidades Autónomas (CC.AA.) limítrofes que se han tomado como ejemplo: La Rioja y el País Vasco. En el capítulo 4 se comenta la situación concreta que se encuentra a la hora de aplicar la normativa legal en la C.A. de La Rioja.

De la normativa vigente se extrae la definición de conceptos y terminología aplicable que resulta necesaria establecer antes de abordar con rigor este tema.

2.1. Definiciones

2.1.a Medicamento veterinario

Se define como MV toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales, o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico clínico veterinario (3-7).

Los MV legalmente reconocidos en España son los siguientes:

- Las especialidades farmacéuticas de uso veterinario.
- Los medicamentos prefabricados de uso veterinario.
- Las premezclas medicamentosas y los productos intermedios elaborados con las mismas con destino a piensos.
- Las fórmulas magistrales destinadas a los animales.
- Los preparados o fórmulas oficinales.
- Las autovacunas de uso veterinario.

2.1.b. Receta veterinaria

Se entiende por receta veterinaria el documento normalizado por el cual los facultativos legalmente capacitados prescriben la medicación para su dispensación por los centros autorizados (5-7). Estas recetas deberán cumplir con los requisitos que se establecen de acuerdo con el apartado 4 del artículo 85 de la Ley 25/1990, expuesto en el punto 3.5 de este trabajo (Figura 1).

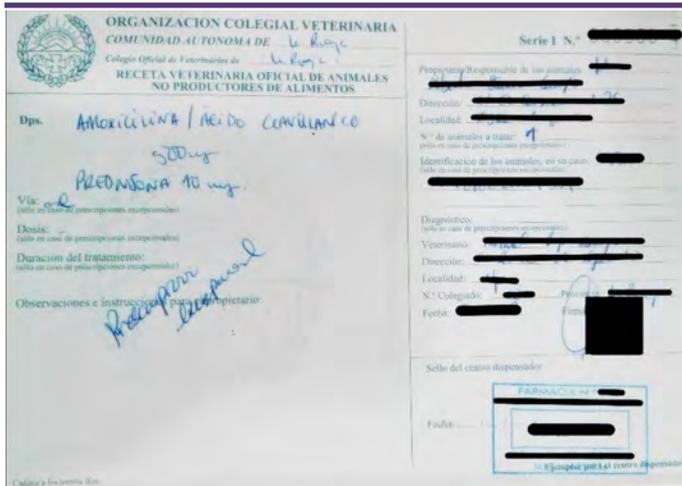


Figura 1. Ejemplo de receta veterinaria llegada a la Farmacia

2.1.c. Tiempo de espera

Periodo de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, a fin de proteger la salud pública, garantizando que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos de residuos de sustancias activas fijados de conformidad con el Reglamento (CEE) número 2377/1990 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de los medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (3,4).

2.1.d. Pienso medicamentoso

Todo pienso que lleva incorporado una premezcla medicamentosa (5-7).

3. LEGISLACIÓN ACTUAL

Como se ha explicado anteriormente, mediante la recopilación de la normativa vigente a diferentes niveles (europea, nacional y autonómica), nos disponemos a dar respuesta a algunas de las preguntas que surgen asiduamente a la hora de afrontar el tema de los MV. Entre estas preguntas se encuentra el tema central de este trabajo: establecer el papel del farmacéutico en la venta y distribución de estos medicamentos.

3.1. Sobre prescripción: ¿qué medicamentos necesitan prescripción?

La legislación europea (3,4) se completa con la española (5-7) al establecer los MV que deben prescribirse para su dispensación:

- Medicamentos de administración directa por el veterinario. En los que se incluyen gases medicinales y medicamentos inmunológicos.
- Medicamentos cuyo suministro o utilización están sujetos a res-

tricciones oficiales como las de los convenios de las Naciones Unidas contra el tráfico ilícito de sustancias estupefacientes y psicotropas.

c) Los destinados a tratamientos o procesos patológicos que requieran un diagnóstico preciso previo o que interfieran en acciones diagnósticas posteriores.

d) Medicamentos destinados a animales productores de alimentos exceptuando aquellas sustancias que no entrañan ningún riesgo directo o indirecto, incluso si se administra incorrectamente, para los animales tratados, las personas que lo administran, las personas que consumen sus productos o el medio ambiente.

e) Prescripción excepcional por vacío terapéutico, incluidos preparados oficiales, fórmulas magistrales y autovacunas.

f) Medicamentos de uso humano para uso animal.

Se establece que sea el veterinario quien deba llevar un registro que contenga la fecha de examen de los animales, la identificación del propietario, el número de animales tratados, el diagnóstico, los medicamentos prescritos, las dosis administradas, la duración del tratamiento y los tiempos de espera recomendados. Toda esta información deberá guardarla durante al menos cinco años (7).

3.2. Sobre dispensación: ¿quién puede dispensar los MV y dónde?

La legislación española (5-7) nombra como únicos centros dispensadores de MV a las OF. Aún así, las entidades o agrupaciones ganaderas y los establecimientos comerciales detallistas también podrán dispensar MV siempre que tengan la debida autorización y que estén bajo el control de sus respectivos servicios farmacéuticos.

Al igual que en medicamentos de uso humano, el papel de los almacenes distribuidores será únicamente el abastecer de estos medicamentos a los centros dispensadores.

3.2.a. Oficinas de farmacia

Las OF, además de poder dispensar los MV, serán los únicos centros autorizados en la elaboración y dispensación de formulaciones magistrales y preparados oficiales.

En caso de desabastecimiento de un MV y siempre que se obtenga la conformidad del interesado, solo el farmacéutico/a podrá realizar una sustitución por otro con la misma composición, forma farmacéutica, vía de administración y dosificación. De esta posibilidad quedan excluidos los medicamentos inmunológicos y aquellos que determine el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de acuerdo con el de Sanidad y Consumo por su biodisponibilidad y estrecho margen terapéutico.

En caso de urgencia o lejanía de una OF, también podrán ponerse a disposición botiquines de urgencia para la dispensación de MV, pero deberá estar vinculado con un establecimiento autorizado dispensador de estos medicamentos (5-12).



3.2.b. Entidades o agrupaciones ganaderas

Según el artículo 85 del Real Decreto de 1995 (5), las entidades o agrupaciones ganaderas interesadas en la dispensación de MV deberán disponer de locales acondicionados para su almacenamiento, deberán llevar a cabo un programa zoonosanitario aprobado por la Comunidad Autónoma correspondiente y deberán estar bajo la supervisión de un servicio farmacéutico y un servicio veterinario.

Otro de los requisitos que deben cumplir este tipo de entidades es la dispensación exclusiva a los miembros que formen dicha agrupación. Por tanto, el ámbito de actuación podrá ser tan amplio como el que abarquen las explotaciones ganaderas, pero se requerirán tantos servicios farmacéuticos como centros de dispensación y tantos servicios veterinarios como sean necesarios para la realización de visitas periódicas a las explotaciones.

3.2.c. Establecimientos comerciales detallistas

Los establecimientos comerciales detallistas también podrán dispensar MV (incluidos los piensos medicamentosos) a clínicas veterinarias, entidades ganaderas y propietarios de animales domésticos. Esta dispensación deberá realizarla el farmacéutico o bajo su supervisión (5-7).

En la legislación del País Vasco se especifica que, durante las franjas horarias en las que el farmacéutico no estuviera presente, se actuará según el plan de trabajo establecido por el farmacéutico responsable a quien el Colegio Oficial de Farmacéuticos denomina "Farmacéutico Garante", cuyo papel se desarrolla más adelante (9,10). Esta figura también está presente en La Rioja, aunque no se especifique en la legislación.

Por otro lado, los MV destinados a peces de acuario, pájaros de casas particulares, palomas mensajeras, animales de terrario, pequeños roedores, hurones y conejos utilizados únicamente como animales de compañía, que no contengan sustancias que exijan un control veterinario y que no requieran prescripción veterinaria, también podrán comercializarse en establecimientos minoristas autorizados (comúnmente llamados "tiendas de animales" o "pajarerías"). Esto supone que los establecimientos tienen que ser aptos para el almacenamiento de este tipo de medicamentos y llevar un control documental de las dispensaciones (5).

3.3. Sobre documentación y requisitos necesarios para posesión y transferencia de medicamentos veterinarios

3.3.a. Autorización y registro

Para tener y comercializar MV con propiedades anabolizantes, antiinfecciosas, antiparasitarias, antiinflamatorias, hormonales o psicótropas se necesita autorización. En La Rioja (11,12), aquellos centros que dispongan esa autorización, deben estar presentes en el Re-

gistro Oficial de Centros Relacionados con los Medicamentos Veterinarios. Una vez que tengan la autorización, deberá guardarse un registro de los movimientos de estos medicamentos durante cinco años (7).

Los propietarios o responsables de animales productores de alimentos también deben justificar la adquisición, posesión y administración de MV a dichos animales. Para ello deberán guardar la copia de la receta durante los cinco años siguientes a su administración, incluso cuando el animal sea sacrificado durante ese periodo (5-8).

3.3.b. Requisitos de los almacenes de distribución

Los almacenes mayoristas de distribución deben reunir ciertos requisitos, entre los que se encuentran (5-8):

- a) Condiciones de locales e instalaciones que permitan asegurar el mantenimiento de la calidad de los MV.
- b) Instalaciones diferenciadas para estupefacientes y psicótopos y para medicamentos de uso humano.
- c) Presencia de personal técnico cualificado (Director Técnico Farmacéutico)

3.3.c. Requisitos de agrupaciones ganaderas y establecimientos detallistas

La legislación del País Vasco (9,10) y de La Rioja (11,12) coinciden en que las entidades o agrupaciones ganaderas y los establecimientos comerciales detallistas deben reunir, para su autorización, los siguientes requisitos:

- a) Condiciones de locales e instalaciones que permitan asegurar el mantenimiento de la calidad de los MV.
- b) Posesión de un servicio veterinario y un servicio farmacéutico.
- c) Diferenciación de la zona de atención al usuario y el almacén.
- d) Almacenamiento de estupefacientes, psicótopos y otras sustancias sometidas a control especial, bajo la responsabilidad y custodia del técnico farmacéutico.
- e) Posesión de un archivo en el que consten los documentos y registros obligatorios (recetas, transacciones realizadas, etc.)

El farmacéutico responsable o farmacéutico garante podrá hacerse cargo también de otros servicios farmacéuticos (hasta un máximo de cuatro como se especifica en la legislación del País Vasco (9)) siempre que demuestre el cumplimiento de sus funciones y obligaciones, valorándose su disponibilidad, residencia y volúmenes de dispensaciones del Centro.

3.4. Sobre entidades oficiales de control y autorización: ¿quién controla y autoriza?

Una vez que el centro demuestre tener personal técnicamente capacitado y el local y equipos adecuados para la conservación y manipulación de MV, podrán acceder a solicitar una autorización de dispensación.



Generalmente, esta autorización la otorgará de manera expresa y justificada, la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (en La Rioja, la Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (12) y en el País Vasco, el Departamento de Agricultura, Pesca y Política Alimentaria (10)), de acuerdo con la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo (5).

3.4.a. Autorización de los laboratorios preparadores de MV

Para que un laboratorio pueda fabricar MV o cualquiera de los procesos que ello implica como el envasado, el acondicionamiento y la presentación de venta, debe solicitar una autorización que le será dada por la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de acuerdo con la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo. Una vez autorizado, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, lo hará público en el Boletín Oficial del Estado (BOE).

Para su autorización, el laboratorio deberá disponer de un director técnico, un responsable de fabricación y un responsable de control de calidad. Estos últimos, bajo la autoridad del director técnico.

En la solicitud, además de lo mencionado anteriormente, se deberá detallar los MV y las formas farmacéuticas que pretenda fabricar.

3.4.b. Oficinas de farmacia y almacenes de distribución

Tanto en La Rioja como en el País Vasco, las OF y almacenes de distribución farmacéutica de uso humano que ya estén autorizados por sus respectivas Consejerías de Salud, quedan exceptuados de solicitar su inclusión en el Registro Oficial de Centros relacionados con los MV (9-12).

Sin embargo, deberán comunicar a las respectivas Consejerías de Salud su intención de dispensar o distribuir este tipo de medicamentos. Esta será la encargada de remitir la información, de manera anual, a la Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural que corresponda, quien otorgará dicha autorización tras verificar que los datos expuestos en la solicitud y las condiciones del establecimiento sean correctos.

3.4.c. Entidades o agrupaciones ganaderas

Una vez que la agrupación ganadera demuestre cumplir con los requisitos mencionados anteriormente y que dispongan de la presencia de al menos un veterinario, por un lado, y por el otro, un farmacéutico al frente del servicio farmacéutico, podrá pedir la autorización de dispensación de MV a las Consejerías de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Una vez autorizado, solo podrán distribuir MV a los miembros que compongan dicha agrupación.

Actualmente, La Rioja no dispone de ninguna agrupación ganadera mientras que en el País Vasco se encuentra la entidad ABERE, situada en Vitoria (14).

3.4.d. Establecimientos comerciales detallistas

Lo mismo ocurre en el caso de los establecimientos detallistas. Una vez que entreguen la documentación pertinente en la que demuestren tener espacios que cumplan con las condiciones para el almacenamiento y dispensación de MV y la contratación de un servicio farmacéutico que asegure esas condiciones y el correcto cumplimiento del servicio de dispensación, podrán solicitar la autorización a las Consejerías de Agricultura, Ganadería y Pesca.

En este momento, La Rioja cuenta con seis establecimientos comerciales detallistas autorizados (cuatro de ellos en Logroño) mientras que el País Vasco cuenta con 21 (solo uno situado en Vitoria) (14).

3.5. Sobre recetas

Las recetas de MV estarán formadas por una parte original destinada al centro dispensador y dos copias: una para el propietario o responsable de los animales y otra para el veterinario que efectúa la prescripción. No podrán superar el tratamiento en más de un mes. En este documento debe aparecer (5-8) (Figura 1):

- Datos del prescriptor: Nombre y dos apellidos, dirección completa, provincia del Colegio al que pertenece, número de colegiado y NIF.
- Datos del propietario o responsable de los animales: nombre y apellidos, dirección y, si es el caso, el Código de Registro de la explotación ganadera.
- Medicamento: denominación legible, forma farmacéutica, presentación y número de ejemplares a dispensar en el caso de que existan varias.
- Tiempo de espera en los animales productores de alimento con destino al consumo humano, aunque sea nulo.
- Animal: especie y número.
- Frases: "Válido solo para un medicamento" y "Caduca a los diez días". Se pueden encontrar al reverso de la receta.
- Firma y rúbrica del prescriptor y fecha de prescripción.

Las instrucciones sobre el uso o la administración del medicamento podrán figurar en la receta o en la copia destinada al propietario o responsable.

Sin embargo, guías publicadas por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos especifican que todos estos apartados deberán estar en las recetas destinadas a animales productores de alimentos de consumo humano mientras que en el caso de animales domésticos, para que la receta sea válida y pueda ser dispensado el medicamento, deben tener como mínimo los datos relativos al pres-



criptor (nombre y dos apellidos, firma, dirección completa, número de colegiado y provincia de colegiación), datos relativos a la prescripción (denominación del medicamento, forma farmacéutica y número de envases) y la fecha de prescripción (15).

El centro dispensador y el veterinario que prescribe deberán conservar las recetas durante al menos cinco años mientras que la copia destinada al propietario será retenida también por este hasta pasados los seis meses después de realizar el tratamiento y el tiempo de espera que figura en ella (5-8).

3.6. Sobre fórmulas magistrales y preparados oficinales

La formulación magistral, tanto en humanos como en animales, está experimentando una mayor demanda en los últimos años.

En el caso de la veterinaria, algunas de las causas son:

- La presencia de lagunas terapéuticas ("medicamentos huérfanos", uso de dosis diferentes a las disponibles, elaboración de medicamentos con principios activos que no se comercializan combinados, etc.).
- La adaptación del medicamento a las necesidades del animal.
- La preparación de medicamentos de escasa estabilidad como es el caso del permanganato potásico (uso en descontaminación de peceras), con una caducidad de siete días.

Este recurso forma parte de lo que la normativa veterinaria define como "prescripción excepcional por vacío terapéutico" o "prescripción en cascada". Por lo tanto, para que el veterinario pueda prescribir una fórmula, el medicamento que se quiere preparar no debe estar disponible en el mercado ya que la normativa legal establece que la formulación magistral debe ser el último recurso terapéutico en el caso de los animales.

La orden veterinaria para la elaboración de una fórmula magistral o de un preparado o fórmula oficial se extenderá en el modelo de receta normalizado, pero en ella el veterinario tendrá que incluir la composición tanto cuantitativa y como cualitativa, el proceso morboso que se pretende tratar y especie animal a la que se destina y la cantidad que debe elaborarse (16).

Como se ha indicado, la fórmula magistral solo puede ser preparada por un farmacéutico o bajo su supervisión y dispensada en las OF.

3.7. Sobre envases

La legislación (3-8) indica la conveniencia, tanto para aumentar la información del usuario como para mejorar la protección de los consumidores en el caso de los animales productores de alimentos, reforzar las disposiciones relativas al etiquetado y a los prospectos de los medicamentos veterinarios.

Para ello deberán llevar un mínimo de caracteres legibles (Figura 2):

- Denominación del medicamento.

b) Composición cualitativa y cuantitativa en principios activos por dosis.

c) Número de lote.

d) Número de la autorización de comercialización.

e) Nombre o la razón social y el domicilio o la sede social del titular de la autorización de comercialización y, en su caso, del fabricante.

f) Especies animales a las que esté destinado, modo y vía de administración.

g) Tiempo de espera, aunque sea nulo en caso de animales productores.

h) Fecha de caducidad.

i) Precauciones de conservación, si las hay.

j) Precauciones especiales que hayan de tomarse al eliminar los medicamentos sin usar y los productos de desecho derivados de los medicamentos, si los hay.

k) Frase "para uso veterinario"

l) Símbolos en el ángulo superior derecho:

- Dispensación con receta veterinaria.
- Dispensación con receta de estupefacientes.
- Dispensación de psicótropos anexo II del RD 2829/1977.
- Dispensación de psicótropos anexo I del RD 2829/1977.
- Conservación en el frigorífico.
- Conservación en congelación.

m) Igualmente deberán figurar las siguientes siglas según caso:

- AV junto con "Administración exclusiva por el veterinario", cuando el medicamento tenga que ser administrado exclusivamente por el veterinario.
- En todos los casos, deberá figurar la leyenda: "Uso veterinario".
- En el caso particular de las premezclas medicamentosas deberá figurar la leyenda: "Premezclas medicamentosas para piensos".

3.8. Sobre el papel del veterinario

Las funciones de Técnicos Veterinarios son (5-8):

- Garantizar el cumplimiento de los programas zoonosológicos.
- Prescripción de los medicamentos.
- Supervisión de los tratamientos y del cumplimiento de los tiempos de espera.
- Supervisión del servicio veterinario de establecimientos comerciales detallistas y agrupaciones ganaderas.
- Custodiar las recetas veterinarias dispensadas, debiendo conservarlas a disposición de las autoridades durante al menos cinco años.

Además, el clínico veterinario está autorizado para adquirir y administrar MV a animales bajo su directa dirección y control, en casos de urgencia o lejanía de otros centros dispensadores, o en el caso que así lo requiera el medicamento administrado (botiquín de urgen-

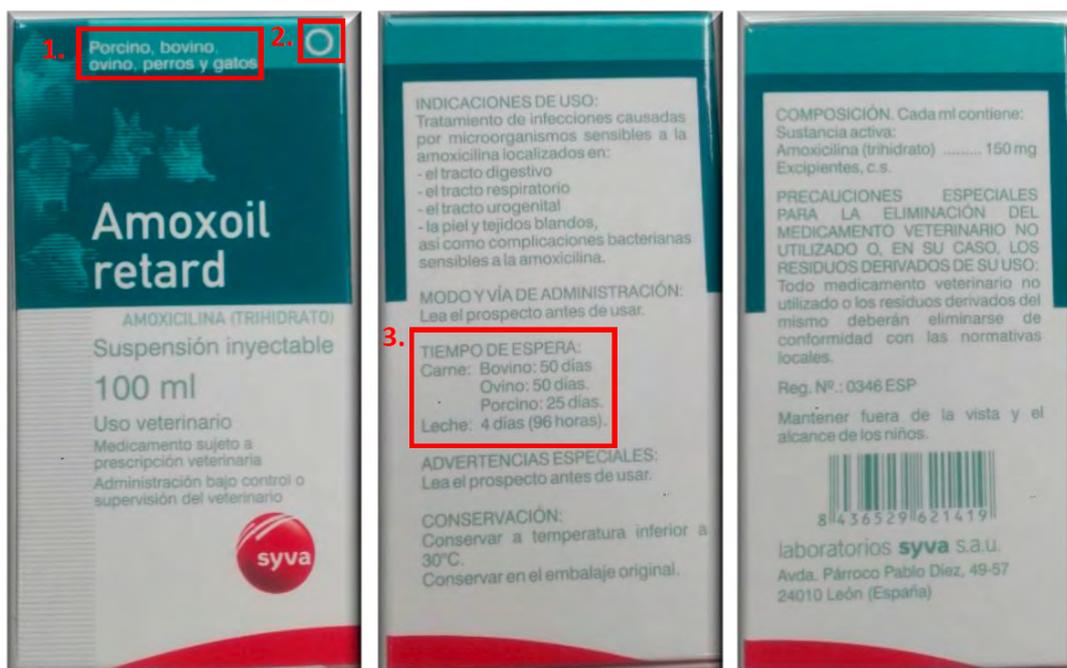


Figura 2. Ejemplo de envase de MV donde se indican elementos como: 1. Animales a los que está destinado, 2. Necesidad de receta, 3. Tiempo de espera.

cia), siempre que nada de ello implique actividad comercial.

Al hacer uso de su botiquín, el veterinario deberá:

- a) Suministrar al propietario solo la cantidad mínima necesaria para realizar el tratamiento de urgencia.
- b) Extender la receta con destino al propietario tal y como se ha explicado anteriormente.
- c) Justificar ante el centro dispensador dicha dispensación en el plazo de dos meses.

En el caso de animales productores de alimentos de consumo humano, el veterinario será el responsable de las posibles reacciones adversas y de los efectos residuales no previstos.

3.9. Sobre el papel del farmacéutico

La legislación fija las funciones de los Técnicos Farmacéuticos como (5-8):

- a) Garantizar el cumplimiento la legislación sobre dispensación de MV.
- b) Asegurar el correcto almacenamiento de los medicamentos y garantizar su legitimidad de origen.
- c) Verificar las condiciones sanitarias de transporte, de entrada y salida de medicamentos.
- d) Vigilar, controlar y custodiar las recetas veterinarias dispensadas, debiendo conservarlas a disposición de las autoridades durante al menos cinco años.
- e) Supervisar el cumplimiento de la legislación especial sobre estupefacientes y psicótropos y exigir la adopción de las medidas adecuadas.

f) Colaborar en los programas zoonosarios que requieran de sus servicios profesionales.

g) Elaboración o supervisión de la elaboración de fórmulas magistrales o preparados oficinales.

Tampoco debemos olvidar la importancia de la atención farmacéutica incluso en el ámbito veterinario.

Para ser responsable del servicio farmacéutico de un establecimiento comercial detallista o de una agrupación ganadera, el farmacéutico deberá estar colegiado y no ser titular de OF. Una vez que cumpla con estos requisitos, su presencia y actuación profesional deberá garantizar el correcto cumplimiento de las funciones que tiene legalmente encomendadas.

En el País Vasco, la presencia física del farmacéutico garante estará fijada por el Director de Ordenación Sanitaria con la conformidad del Consejero de Sanidad, teniendo en cuenta el volumen de actividad y los medicamentos dispensados (9-10). En La Rioja no existe normativa específica.

El responsable del servicio farmacéutico realizará un plan de trabajo en el que especifique:

- a) Calendario y horario previsible de presencia semanal.
- b) Número de establecimientos de los que sea responsable y su ubicación física.*
- c) Procedimientos de trabajo.

*El farmacéutico no podrá ser responsable de más de cuatro establecimientos en el País Vasco mientras que en La Rioja, no se especifica.



4. APLICACIÓN DE LA LEGISLACIÓN VIGENTE EN LAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS: SITUACIÓN EN LA C.A. DE LA RIOJA

Con el fin de contrastar y completar la información obtenida de la legislación europea, española y las autonómicas y conocer su aplicación real, se realizaron visitas a varias de las diferentes entidades implicadas en la venta y distribución de MV en la C.A de La Rioja.

4.1. Almacenes de distribución mayoristas

COFARES es una de las cooperativas de distribución farmacéutica más importante de España.

El almacén, situado en Logroño, al que se realizó la visita solicitó la autorización conjunta de almacenamiento y distribución de medicamentos de uso humano y veterinario a la Consejería de Sanidad de La Rioja y, una vez concedido, ha estado distribuyendo estos medicamentos exclusivamente a las OF de esta comunidad.

Dispone de una zona específica, separada de los medicamentos de uso humano, para el almacenamiento de los medicamentos de uso veterinario. También señalan que, actualmente, están desarro-



Figura 3. Campaña publicitaria Veterinaria COFARES.

llando una División específica de MV de la cual ya comienza a llegar información a las farmacias (Figura 3).

Debido a la implantación en Europa del código BIDI o data-matrix en los envases de los medicamentos con el fin de evitar falsificaciones (Figura 4), ha sido inevitable hablar sobre el uso de este código en los MV. Señalan que los medicamentos de uso veterinario no están obligados a llevar el BIDI, por eso, los pocos que lo llevan no están cargados en el repertorio y cuando se leen, dan error. Actualmente, en COFARES tienen alrededor de 250 referencias de MV.

4.2. Oficina de Farmacia

Basándome en las prácticas tuteladas realizadas durante seis meses en una farmacia tipo de Logroño, se han podido observar ciertos detalles sobre la dispensación de MV.

Durante el año 2018/19, han llegado a la farmacia al menos 41 recetas veterinarias, representadas en la siguiente tabla (Tabla 1).

A pesar de que el número de recetas veterinarias que llegan a las farmacias dependen mucho de su ubicación y de la cercanía que haya con clínicas veterinarias, el número de recetas veterinarias que

reciben los farmacéuticos es muy reducido en comparación con el número total de recetas de medicamentos de uso humano.



Figura 4. Código BIDI incorporado en el envase de un medicamento

En este caso, cabe destacar que 21 de las 41 recetas veterinarias recibidas son o contienen antibióticos.

También, llama la atención la variedad de estructura e información que contienen dichas recetas (Anexo). Algunas de ellas, con muy escasa información; solo el nombre del medicamento, sello y firma del veterinario prescriptor cuando debería incluir además la dosis, forma farmacéutica, fecha de prescripción, dirección del veterinario y, en la mayoría de los casos, la frase "prescripción excepcional" al tratarse de la dispensación de un medicamento de uso humano con el fin de tratar a un animal por vacío terapéutico.

Tabla 1. Prescripciones recibidas desde el 3 de Enero de 2018 hasta el 10 de Enero del 2019 en la Farmacia Tipo de Logroño

Nº Recetas	Fármaco	Acción farmacológica
9	Metronidazol 250 mg	Antibiótico y antiparasitario
5	Amoxicilina/ácido clavulánico 500/125 mg	Antibiótico
5	Fenobarbital 100 mg	Anticonvulsivante
3	Dexametasona/Tobramicina 1mg/mL + 3 mg/mL	Corticoide + antibiótico (conjuntivitis)
2	Tramadol 50 mg	Analgésico opiáceo
2	Atropina 10 mg/mL	Antagonista H2 (acidez)
1	Famotidina 10 mg	Midriático (úlceras corneales)
1	Gentamicina 5 mg/g	Antibiótico
1	Doxiciclina 100 mg	Antibiótico
1	Meloxicam 1,5 mg/mL	Antiinflamatorio
1	Blastoestimulina 1 mg/g	Antibiótico, cicatrizante (heridas)
1	Espiramicina	Antibiótico
1	Meglumina antimonio 300 mg/mL	Antiparasitario (Leishmania)
1	Ciclosporina 25 mg	Inmunosupresor
1	Diazepam 5 mg	Antiepiléptico
1	Prednisona 10 mg	Antiinflamatorio
1	Metoclopramida 1 mg/mL	Antiemético
1	Doxiciclina 100 mg	Antibiótico
1	Oxitetraciclina 1 mg/g	Antibiótico (conjuntivitis)
1	Espiramicina/metronidazol 750000 UI/125 mg	Antibiótico
1	Lorazepam 1 mg	Ansiolítico
1	Ketoconazol	Antifúngico
1	Bromuro de potasio	Anticonvulsivante



Por otra parte, comparando una de las farmacias de Vitoria con esta situada en Logroño, durante el mismo periodo de tiempo han recibido aproximadamente 48 recetas veterinarias (12 de ellas, fórmulas magistrales destinadas a animales domésticos), es decir, han llegado 1,5 veces más recetas veterinarias. Así pues, la frecuencia con la que llegan recetas veterinarias a la farmacia de Logroño es menor. Uno de los motivos a los que se puede deber es al mayor número de mascotas que hay en el País Vasco. Solo en perros, se registraron 320.000 en el año 2016 (17) mientras que, en ese mismo año, en La Rioja se registraron 55.917 (18). Hay que mencionar que, de las recetas veterinarias recibidas en la farmacia de Vitoria, el 20 % eran fórmulas magistrales destinadas a animales domésticos.

Además de medicamentos con receta, en la OF se dispensan otros medicamentos cuya prescripción no es obligatoria por lo que es difícil realizar una estimación total de la dispensación de medicamentos que irán destinados a animales. Además, los dueños de mascotas también consiguen la mayoría de los medicamentos a través del veterinario a pesar de que la venta con fines comerciales por parte de este está prohibida por ley. Sin embargo, estas personas se encontrarán con la aplicación de un 21 % de IVA en las clínicas veterinarias mientras que en los establecimientos comerciales detallistas y OF se aplica el 10% a los MV, considerados productos sanitarios (19).

Esta aplicación de IVA la desconocen muchos usuarios ya que los propietarios de mascotas están totalmente acostumbrados a obtener los MV en las clínicas veterinarias. Tampoco ayuda la escasez de farmacias que ofrecen productos dirigidos a mascotas por lo que, son pocos los usuarios que cuentan con este canal para obtener los MV.

Sin embargo, el aumento de animales de compañía plantea a las farmacias la opción de crear una sección específica de veterinaria que atraería a ellas un nuevo sector de la población (20).

El tema no supone nada nuevo ya que en el año 2014 se abrió en Madrid la primera farmacia especializada en veterinaria, pero su titular, la farmacéutica Esther Guerrero Martín, confiesa en varias entrevistas (21) que su apertura no fue nada fácil ya que hay un gran desconocimiento sobre esta especialidad farmacéutica, incluso dentro de los propios ministerios.

4.3. Clínica veterinaria

También se pudo sacar conclusiones muy interesantes tras preguntar acerca de la prescripción y dispensación de MV a un veterinario.

En general, los veterinarios son reticentes a hacer recetas porque prefieren ser ellos los que dispensen los medicamentos. Sin embargo, no debemos olvidar que la legislación deja claro que los veterinarios no pueden dispensar MV con fines comerciales y que esta práctica supone a los propietarios de animales pagar más debido a la aplicación de un 21% de IVA (19).

Aun así, es tan frecuente esta práctica, que a los dueños de animales domésticos les parece normal adquirir los medicamentos por esta vía y desconocen la opción de comprarlos a través de las OF o los establecimientos comerciales detallistas.

Por otra parte, una vez que el veterinario se decide a completar una receta, no es raro que desconozca o que, aun conociéndolos, no escriba todos los datos obligatorios que deben figurar en ella. Pero, a pesar de ello, estas recetas se siguen aceptando en las OF y en los establecimientos comerciales detallistas.

Esto se debe al gran desconocimiento de la legislación que hay por parte de veterinarios y farmacéuticos y que, al tratarse de recetas privadas, la revisión de datos de estos documentos en las farmacias no es tan exhaustiva y es poco habitual su reclamación.

La conclusión de esta visita fue la necesidad de realizar campañas informativas por parte de los Colegios Oficiales destinadas a los profesionales implicados y a los propietarios de animales.

4.4. Establecimiento comercial detallista

Otra de las visitas que se realizó fue a un establecimiento comercial detallista, con el fin de ver cuál es la función de un farmacéutico garante.

Para ser farmacéutico garante es necesario estar colegiado y no ser titular de OF. Una vez que cumple esos requisitos, el siguiente paso es firmar un plan de trabajo con el propietario del establecimiento en el que figuren aspectos como: calendario y horario previsible de presencia semanal, número de establecimientos de los que sea responsable el farmacéutico y su ubicación física, y procedimientos de trabajo.

En este caso concreto, la farmacéutica iba una vez al mes para comprobar el registro de temperaturas tanto del establecimiento como del frigorífico, realizar un control de entrada y salida de MV que incluye contrastar el número de medicamentos que se han dispensado en ese mes con el número de recetas recibidas, comprobar las caducidades, asegurar un plan de actuación en el uso racional de medicamentos y, aunque con menos frecuencia, confirmar la retirada o inmovilización de lotes que comunique la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios o AEMPS (última retirada: 13 de mayo de 2019 (22), o la incorporación de otros nuevos (23).

Aquí también se habló del desconocimiento que hay tanto de los propietarios de animales como entre los profesionales y se manifestó una preocupación por la falta de regulación ya que se comercializan muchos MV sin la debida autorización: veterinarios que usan los medicamentos de su "botiquín de urgencia" con fines comerciales, establecimientos comerciales que venden piensos medicamentosos sin autorización, tiendas de animales que dispensan medicamentos que necesitan prescripción, etc.

Generalmente, la frecuencia con la que llegan recetas vete-

rinarias a este tipo de establecimientos es considerablemente mayor que en las OF.

Debido a las continuas actualizaciones en estos últimos años sobre la regulación del uso de medicamentos en ganadería, tanto veterinarios prescriptores como los centros dispensadores tienen especial cuidado en que las recetas destinadas a estos animales estén debidamente cumplimentadas, sin embargo, no es así con las prescripciones para animales domésticos. En estos casos, las recetas que llegan al establecimiento pocas veces tienen los datos mínimos necesarios. Otras veces, hacen un uso erróneo de la frase "prescripción excepcional" destinada a los casos en los que hay un vacío terapéutico y hay que recurrir a medicamentos de uso humano o a formulación magistral y cuando hay que ponerla (en la mayoría de las recetas que llegan a las OF), no lo hacen (Figura 1).

Otro de los temas que se abordaron en la visita fue el uso indebido de la medicación de uso humano para el tratamiento de animales. A pesar de ser el mismo principio activo, la forma farmacéutica y la información que viene en el prospecto no es la misma. Por ejemplo, entre las numerosas recetas de antibióticos que llegaron a la farmacia en la que hice las prácticas tuteladas, muchas de ellas eran de metronidazol. En este caso, el veterinario debería haber recetado el medicamento veterinario existente con ese principio activo (Metrobactin®) ya que el comprimido está preparado para partirlo en función de la dosis que haya que dar, ya sea según el peso o la especie de la mascota, y en el prospecto, viene la información relevante al uso de este medicamento en animales (Figura 5).



Figura 5. Comparación de una caja de metronidazol de uso animal con otra de uso humano, número y forma de los comprimidos que contienen

5. OTRAS CONSIDERACIONES

5.1. Venta online

La posibilidad de vender medicamentos de uso veterinario por internet en España es relativamente reciente. De hecho, la ley que lo regula entró en vigor en el año 2016 (24).

En ella se considera centros dispensadores de este tipo de medicamentos tanto a OF legalmente autorizadas para la venta a distancia de medicamentos de uso humano sin receta, como a establecimientos detallistas. Un ejemplo de estos establecimientos autorizados de venta a distancia de medicamentos veterinarios no sujetos a prescripción es el situado en Logroño, "Unomás, Nutrición y salud animal" (www.unomasweb.com) (14).

Solo se podrán dispensar por este medio aquellos MV que no necesiten prescripción. Por lo tanto, queda prohibida la venta online de fórmulas magistrales, preparados oficiales, MV no autorizados por la AEMPS, autovacunas de uso veterinario y los medicamentos sujetos a prescripción veterinaria.

Si un centro está interesado en la venta de MV por internet deberá notificarlo directamente a la Consejería de Sanidad correspondiente de cada Comunidad Autónoma, que se encargará de inspeccionar y revisar las ventas por este medio.

Una vez autorizado, la OF o el establecimiento detallista elaborará un sitio web que deberá contener como mínimo: datos de contacto y un enlace al sitio web de la autoridad competente, el nombre del titular y el número de colegiado del farmacéutico, dirección física del centro dispensador, horarios y precios y tiempo estimado para la entrega de los medicamentos. También deberán añadir a la página web el enlace y el logo del Ministerio de Agricultura ya que es la autoridad competente que va a coordinarse con la AEMPS y la Consejería de Sanidad en este asunto.

Al igual que en los sitios web de venta de medicamentos de uso humano, es necesario la existencia de un logo de identificación que asegure la venta legal de los MV (similar al logo Distalfarma, Figura 6) sin embargo a día de hoy, este todavía no está disponible.

A pesar de que la venta sea a distancia, la actuación profesional del farmacéutico es requisito inexcusable para la dispensación al público de medicamentos a través de sitios web. Ya sea en OF o en establecimientos detallistas. Y será deber del farmacéutico valorar la pertinencia o no de la dispensación y proporcionar asistencia, a través de servicios de farmacovigilancia y seguimiento terapéutico (15).



Figura 6. Logo Distalfarma.

5.2. Caso particular de los antibióticos

En veterinaria, los antibióticos se emplean para el tratamiento de animales infectados y como profilaxis para prevenir infecciones (especialmente en el manejo de un alto número de animales en espacios reducidos), pero también se han usado con la finalidad de promover el crecimiento y engorde de los animales. Desde el año 2006, esta práctica está prohibida en la Unión Europea (UE), sin embargo, sigue siendo legal en Asia, África, Oceanía y en todo el continente americano.

Este uso indebido de los antibióticos contribuye de manera importante a la aparición de bacterias multirresistentes con las que podemos entrar en contacto fácilmente a través de alimentos y agua contaminadas o mediante contacto directo con heces de animales (ani-



Figura 7. Logo PRAN



Figura 8. Logo Programa Reduce (cunicultura)

males de compañía, abono, etc.).

Como respuesta al abuso de antibióticos tanto en humanos como en animales productores de alimentos, en 2014 la AEMPS creó en España un Plan estratégico para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos (PRAN) (Figura 7), en concreto, el Programa Reduce, enfocado al uso de antibióticos en avicultura, cunicultura y ganado bovino (Figura 8).

Hay que tener en cuenta que además de los ganaderos, los dueños de mascotas también son grupos de riesgo por la adquisición o relación con las infecciones bacterianas ya que el uso de antibióticos en animales de compañía no se encuentra tan controlado.

Por tanto, es fundamental el trabajo conjunto de veterinarios y farmacéuticos para mejorar las herramientas disponibles para obtener datos de consumo de antibióticos por especies animales y conseguir reducir al máximo el uso indebido de estos medicamentos y su diseminación en el medio ambiente, con el fin de ralentizar lo más posible el avance de la resistencia a antibióticos en el mundo (25-27).

5.3. Consideraciones adicionales

La necesidad de controlar el uso de MV por su influencia en la sanidad humana es una realidad. Así, muchos antimicrobianos utilizados en animales destinados a la producción de alimentos son idénticos o están estrechamente relacionados con los utilizados en el ser humano. El uso de estos antimicrobianos en animales destinados a la producción de alimentos puede llevar a la sección y propagación entre ellos de bacterias resistentes a los antibióticos, que después pueden transmitirse al ser humano a través de los alimentos y de otras vías.

Por ello, para mitigar las consecuencias que para la salud humana tiene el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (28) realiza cada cinco años una serie de directrices en las que se hacen recomendaciones y declaraciones sobre prácticas óptimas basadas en evidencias.

- Recomendación I: reducción general del uso de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica en los animales destinados a la producción de alimentos. Categoría de recomendación:

Firme.

- Recomendación II: restricción completa del uso de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica para estimular el crecimiento de los animales destinados a la producción de alimentos ya que, como se ha dicho anteriormente, esta práctica todavía se sigue haciendo en Asia, África, Oceanía y América. Categoría de recomendación: Firme.

- Recomendación III: restricción completa del uso de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica con el fin de prevenir enfermedades infecciosas que todavía no han sido diagnosticadas clínicamente en los animales destinados a la producción de alimentos. Categoría de recomendación: Firme.

- Recomendación IV: restricción del uso de antimicrobianos de importancia crítica y de máxima prioridad para la medicina humana para profilaxis y tratamiento de animales destinados a la producción de alimentos. Categoría de recomendación: Condicional.

A pesar de que estas recomendaciones propuestas por la OMS se refieren a animales productores de alimentos, también se debería plantear la regulación del uso de antibióticos en el resto de animales.

Estudios recientes en Reino Unido hablan sobre el elevado porcentaje de consultas de perros y gatos en las que se prescribieron y/o administraron antibióticos. Y en EE.UU., revelaron que tan solo un 17 % de los casos en los que se prescribió antibióticos eran infecciones confirmadas (26)

Por tanto, estos datos junto con el importante aumento de animales domésticos, hace necesaria también la elaboración de guías para el correcto uso de antibióticos en este tipo de animales.

6. CONCLUSIONES

Como se ha podido observar, la legislación que regula hoy en día el proceso de venta y distribución de medicamentos de uso veterinario no está lo suficientemente clara ni a nivel europeo, ni al estatal ni al autonómico. El hecho de que, en España, este tema lo dirijan de manera conjunta dos ministerios diferentes (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ministerio de Sanidad y Consumo), no siempre bien coordinados, también dificulta la resolución de problemas



y toma de decisiones en determinadas ocasiones.

Hemos visto que tampoco se respetan las funciones propias y legalmente establecidas de los profesionales implicados en este proceso. Tanto es así, que es frecuente encontrar cierto intrusismo por parte de los veterinarios en aspectos que la legislación atribuye a los farmacéuticos como puede ser la venta de medicamentos con fines comerciales.

Por otra parte, la falta de información desde los Ministerios hacia los propietarios de animales y de formación desde Colegios y Universidades hacia farmacéuticos y veterinarios acerca de este tema, complica la situación de manera importante ya que, el riesgo de usar de manera incorrecta los MV es muy alto.

Para solucionar este problema en continuo crecimiento, se hace inevitable la necesidad de una revisión de la legislación y de la realización de campañas formativas e informativas sobre la venta y distribución de medicamentos de uso veterinario.

Por tanto, este trabajo supone una llamada de atención a los estamentos legislativos para que coordinen y clarifiquen sus normativas, a las respectivas Facultades para que incluyan este tema en la formación de sus futuros egresados, y a los Colegios Oficiales de Veterinarios y Farmacéuticos sobre la necesidad de realizar campañas formativas e informativas. También resulta necesario realizar inspecciones más frecuentes y exhaustivas para garantizar el cumplimiento de la legislación.

De esta manera podremos contribuir de manera muy positiva en uno de los objetivos de la Agenda para el Desarrollo Sostenible del 2030, la salud y bienestar no solo de los animales, sino también en el de las personas. Porque, como bien dice el lema de los veterinarios: la salud de los animales es la salud del pueblo (*Higia pecoris, salus populi*). Y en esto, los farmacéuticos tenemos un papel muy importante.

7. REFERENCIAS

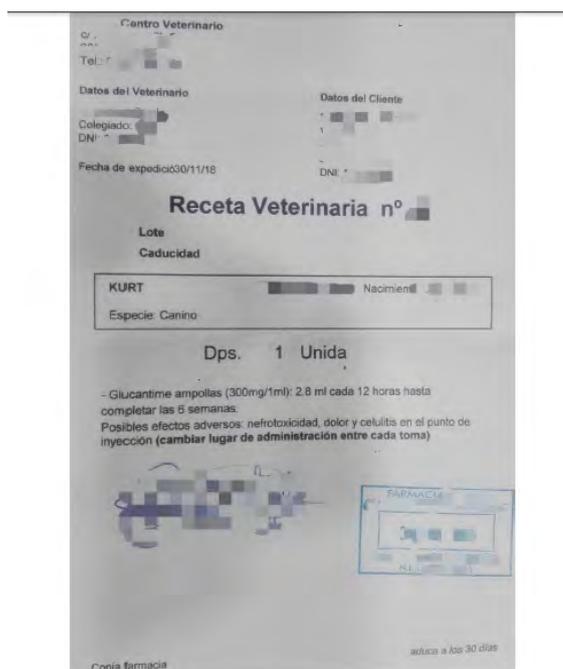
1. Informe Anual de Indicadores: Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2017. p. 95
2. Las mascotas también van a la farmacia. Levante: el mercantil valenciano. 2019 (Consultado: 28 Jul 2019). Disponible en: <https://www.levante-emv.com/vida-y-estilo/salud/2019/07/26/mascotas-farmacia/1905193.html>
3. DIRECTIVA 2001/82/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial de la Unión Europea (L0082/1- L0082/123)
4. DIRECTIVA 2004/28/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 31 de marzo de 2004 que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial de la Unión Europea (L136/58-L136/84)
5. REAL DECRETO 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. BOE nº 53 (pág. 7353-7409)
6. REAL DECRETO 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente. BOE nº 193 (pág. 34044-34084)
7. REAL DECRETO 1132/2010, de 10 de septiembre, por el que se modifica el Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. BOE nº 233 (pág. 81447-81463).
8. LEY 13/2007, de 22 de noviembre, de medicamentos veterinarios. BOE nº 2 (pág. 91-100)
9. DECRETO 1/1997, de 7 de enero, sobre autorización y control de establecimientos y servicios de atención farmacéutica dedicados a la distribución y dispensación de medicamentos veterinarios y de las unidades de fabricación de piensos medicamentosos en la Comunidad Autónoma del País Vasco. BOPV nº 509 (pág. 1606-1619)
10. DECRETO 156/2001, de 30 de julio, sobre autorización y control de los establecimientos relacionados con la distribución y dispensación de medicamentos veterinarios, la fabricación y distribución de piensos medicamentosos y la elaboración de autovacunas de uso veterinario en la Comunidad Autónoma del País Vasco. BOPV nº 4771 (pág. 15947-15960)
11. DECRETO 24/2000, de 19 de mayo, por el que se establecen normas sobre regulación de medicamentos veterinarios y piensos medicamentosos en la Comunidad Autónoma de La Rioja. BOR nº 65 (pág. 2076).
12. LEY 8/1998, de 16 de junio, de Ordenación Farmacéutica de la Comunidad Autónoma de La Rioja. BOR nº 74 (pág. 2379). BOE nº 156 (pág. 21800).
13. González Bueno A, Puerto Sarmiento FJ. Medicamentos veterinarios y piensos medicamentosos. En: Compendio de Historia de la Farmacia y Legislación Farmacéutica. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 2011. p. 365-377.
14. Catálogo de establecimientos, distribuidores o dispensadores autorizados de medicamentos veterinarios y venta a distancia de medicamentos veterinarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Consultado: 4 May 2019). Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es-ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/Higiene-de-la-produccion-primaria-ganadera/medicamentos-veterinarios/buscador-med.aspx>
15. Guía práctica, 28 de septiembre de 2016. Asunto: Dispensación y suministro de medicamentos de uso animal. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (www.portalfarma.com)
16. Del Arco Ortiz de Zárate J, Hidalgo Pérez ME. Formulación magistral en veterinaria (I). Panorama Actual del Medicamento 2018; 48 (418): 1107-1112.
17. Campuzano B. Un perro por cada siete guipuzcoanos. El Diario Vasco. 2018 (Consultado: 2 May 2019). Disponible



- en: <https://www.diariovasco.com/gipuzkoa/gipuzkoa-tierra-perros-20180306141130-nt.html>
18. Fernández A. El ejército canino se multiplica por cuatro en 15 años en La Rioja. La Rioja. 2017 (Consultado: 2 May 2019). Disponible en: <https://www.larioja.com/la-rioja/ejercito-canino-multiplica-20170730235113-ntvo.html>
 19. REAL DECRETO-LEY 20/2012, de 13 de julio, de medidas para garantizar la estabilidad presupuestaria y de fomento de la competitividad. BOE nº 168 (pág. 50428-50518).
 20. Sección veterinaria en OF – Cornejo A. El medicamento veterinario pide paso en la botica urbana. El Global. 2012 (Consultado: 17 feb 2019). Disponible en: www.elglobal.net/hemeroteca/el-medicamento-veterinario-pide-paso-en-la-botica-urbana-AWEG_687373
 21. Núñez Benítez F. Primera farmacia veterinaria en España. Así nació la primera farmacia veterinaria autorizada en España. Animal's Health. 2018 (Consultado: 25 Sep 2018). Disponible en: <https://www.animalshealth.es/profesionales/en-espana-solo-existe-una-farmacia-veterinaria-autorizada>
 22. Circular nº 128/19 (Farmacias), 13 de mayo de 2019. Asunto: Retirada de medicamentos veterinarios. Colegio Oficial de Farmacéuticos de La Rioja.
 23. Circular nº 38/18 (Farmacias), 1 de enero de 2018. Asunto: Notificación anual de movimientos de medicamentos de uso veterinario con principios activos antimicrobianos. Colegio Oficial de Farmacéuticos de La Rioja.
 24. REAL DECRETO 544/2016, de 25 de noviembre, por el que se regula la venta a distancia al público de medicamentos veterinarios no sujetos a prescripción veterinaria. BOE nº 300 (pág 86657-86664)
 25. García Fernández s, Ruiz Garbajosa P, Morosini Reilly MI. Relevancia, prevalencia y mecanismos de resistencia microbiana. En: Uso racional de antibióticos y gestión de residuos. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2018. p. 29-49.
 26. Navarro San Francisco C, Ruiz Garbajosa P, Cantón Moreno R. Estrategias frente a la resistencia, En: Uso racional de antibióticos y gestión de residuos. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2018. p. 51-72.
 27. Cantón Moreno R, Martínez García L, Varas Doval R, González Zorn B. En: Uso racional de antibióticos y gestión de residuos. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2018. p. 73-127.
 28. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.



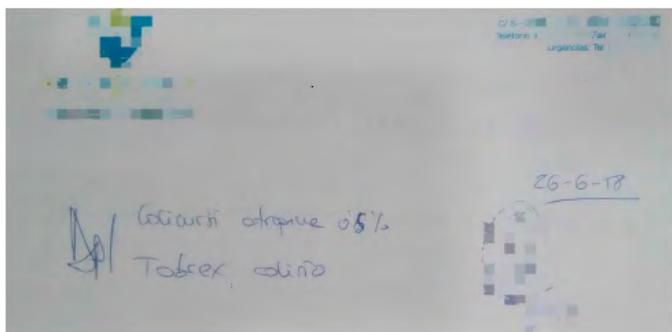
Desde recetas en las que consta incluso los efectos adversos del medicamento hasta aquellas en las que solo figura el nombre del medicamento y la firma del prescriptor:



8. ANEXO

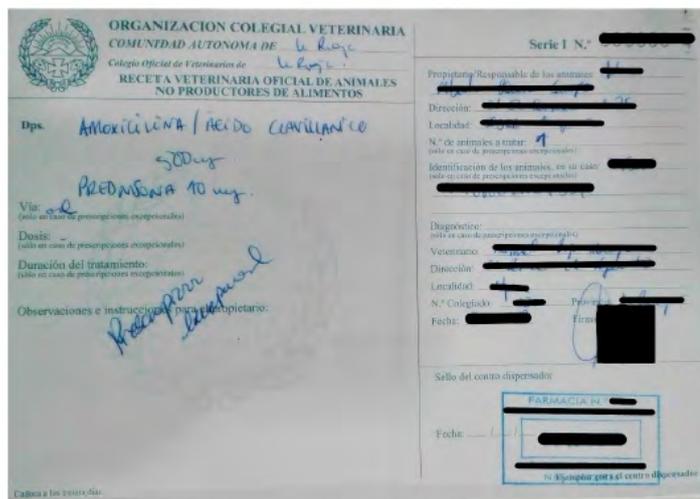
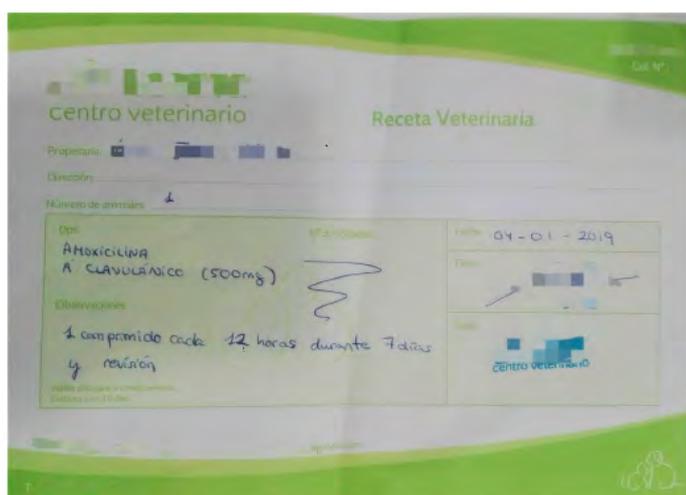
A las farmacias llegan una gran variedad de recetas de medicamentos veterinarios:

Papel del farmacéutico en la venta y distribución de medicamentos veterinarios



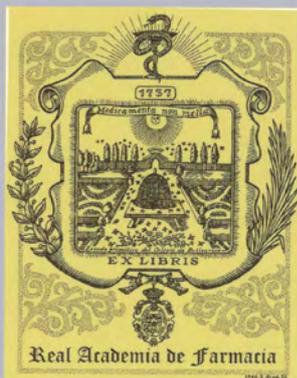
Si desea citar nuestro artículo:
Raquel Hidalgo Sanz
Papel del farmacéutico en la venta y distribución
de medicamentos veterinarios
An Real Acad Farm (Internet).
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 1 (2020) · pp. 75 - 88

Incluso, aun tratándose del mismo medicamento, dependiendo de la receta, la caducidad del documento es diferente:



9. DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en la presente revisión.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES