



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

### **EDITOR**

### José María Martínez García

jmmartinezgar@gmail.com

### DIRECTORA

María Yolanda Martínez Solana

mymartinez@ccinf.ucm.es

# DIRECTOR CIENTÍFICO

José Manuel Bautista Santa Cruz

jmbau@ucm.es

# COMITÉ DE REDACCIÓN

Laura Ballesteros Sanabria

laubal03@ucm.es

Azam Ghazi

aghazi@ucm.es

# **EDITA**

Health Economics, S.L.

C/ Velázquez 157

28002 Madrid

ISSN: 2990-3580

# COMITÉ EDITORIAL

# JOSÉ RAMÓN REGUEIRO GONZÁLEZ-BARROS

regueiro@med.ucm.es

### LOURDES CALVO GARRIDO

lcalvo@ucm.es

### ÁNGEL MANUEL RAMOS DEL OLMO

Angel\_Ramos@mat.ucm.es

# ÁLVARO MARTÍNEZ DEL POZO

alvaromp@ucm.es

### JAVIER ARROYO NOMBELA

jarroyo@farm.ucm.es

### JAVIER ALDA SERRANO

javier.alda@ucm.es

### JESÚS PÉREZ GIL

jperezgil@bio.ucm.es

# **SUMARIO**



ANTICIPA UCM, ejemplo de ciencia cooperativa

Ciencia cooperativa. Impulsar la colaboración para el avance del conocimiento y la resolución de problemas complejos

16

COVID-LOT: proyecto cooperativo universitario para la prospección preventiva de infectividad en grandes colectivos

COMPLUPCR: Un sistema de gestión avanzado de muestras en la red de laboratorios COVID-LOT

Inmunidad y protección antiviral frente al SARS-CoV-2

Producción recombinante de inmunógenos virales

Vehiculización de vacunas mediante partículas de sílice

Vigilancia sanitaria de COVID-19 en animales y medio ambiente

Desinfección y esterilización de materiales sanitarios con CO<sub>2</sub> supercrítico

La utilidad de las matemáticas en tiempos de pandemia

Inactivación de patógenos mediante luz

Respuesta inmunitaria a vacunas

# EDITORIAL

# ANTICIPA UCM, EJEMPLO DE CIENCIA COOPERATIVA

a humanidad se ha caracterizado desde el inicio de los tiempos por dos tipos de iniciativas: las individuales y las colectivas. El avance de la humanidad es el resultado de ambas.

Lo que a veces comienza como una iniciativa individual puede llevar a innovaciones y cambios globales. Es, por ejemplo, el caso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por el bioquímico Kary Mullis en la década de 1980. La PCR permite amplificar y detectar pequeñas cantidades de material genético, lo que ha tenido un gran impacto en el diagnóstico y la investigación en áreas como la virología, la genética, la oncología y la microbiología. Gracias a la PCR, se pueden identificar y caracterizar microorganismos patógenos, estudiar la variabilidad genética y la evolución de virus y bacterias, así como desarrollar nuevas terapias dirigidas a enfermedades genéticas y cáncer. La PCR ha sido fundamental en la lucha contra enfermedades, en la secuenciación de genomas y en la comprensión de la evolución y la biología, y su uso se ha extendido a lo largo y ancho del mundo, convirtiéndose en una herramienta fundamental para la investigación y el diagnóstico médico. La iniciativa individual de Mullis ha proporcionado así otras muchas innovaciones tecnológicas que han venido transformado la investigación biomédica y la forma de entender la biología.

En contraposición, una iniciativa colectiva que se concibió así desde el principio y que ha contribuido sustancialmente al progreso es el Proyecto del Genoma Humano. Este, partió de una colaboración internacional que involucró a científicos y organizaciones de todo el mundo para secuenciar el ADN humano y así obtener una comprensión más completa de la naturaleza codificada en la maquinaria del núcleo de la célula. Esa revolución aún no ha acabado. El proyecto ha tenido tal impacto en la ciencia y en la medicina que ha cambiado no solo el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, sino que ha permitido comprender en detalle la evolución humana y de los organismos vivos al tiempo que ha generado tecnologías genómicas asombrosas.

Tanto las iniciativas individuales como las colectivas -o quizás mejor llamarlas cooperativas- son importantes para una vida más humanizada, también en lo que se refiere a los derechos como personas. El movimiento de derechos civiles en Estados Unidos fue un esfuerzo colectivo para luchar contra la discriminación racial y la segregación en la sociedad. Si bien su enfoque principal fue en la lucha por los derechos de los afroamericanos, su impacto se extendió más allá de esa comunidad. El movimiento ha ayudado a inspirar a otros grupos, lo que ha llevado a cambios éticos significativos en la legislación y la política actual en muchas democracias del mundo.

Las iniciativas individuales pueden ser impulsadas por personas innovadoras y creativas que buscan solucionar problemas específicos o aprovechar oportunidades, mientras que las iniciativas colectivas a menudo implican la colaboración y cooperación de muchas personas y organizaciones para abordar problemas y oportunidades de manera más amplia. La pandemia de COVID-19 ha sido un doloroso recorda-



torio de la importancia de la cooperación científica en la resolución de problemas globales. Desde el comienzo de la pandemia, se ha visto cómo los científicos de todo el mundo han trabajado juntos para entender el virus, desarrollar vacunas y tratamientos efectivos, y proporcionar información crítica para ayudar a los gobiernos a tomar decisiones informadas. La cooperación científica ha demostrado ser esencial para abordar una crisis global de esa magnitud.

Sin embargo, también se ha visto cómo una parte de la competencia científica puede retrasar la respuesta a una crisis. En lugar de compartir información y colaborar en la investigación, algunos países y empresas optaron por mantener reservados sus hallazgos y oportunidades para obtener ventajas competitivas. Así, la pandemia ha mostrado que en estos momentos de elevado desarrollo tecnológico quizás la competencia, incluida la científica, no es el camino más eficaz a seguir. Hay un buen número de ejemplos que

muestran el peligro de anteponer los intereses económicos y políticos por encima de la salud pública y la cooperación global. Se debe aprender de estos ejemplos para trabajar juntos como comunidad científica global, incluyendo las personas cuya formación no es científica, para abordar futuras crisis de manera efectiva y eficiente.

En este primer número de ANTICIPA UCM se han compilado una serie de artículos que son fruto y a la vez ejemplo de cómo el conocimiento acumulado e innovador en una institución de educación superior, en este caso la Universidad Complutense de Madrid, se puso de forma inmediata al servicio de la sociedad con el advenimiento de la pandemia de COVID-19.

En aquellos momentos en los que la transmisión era tan rápida, era decisivo conocer la situación de aquellas personas que la expandían al estar infectados, pero no lo mostraban clínicamente. La capacidad diagnóstica de los sistemas sanitarios se encontraba saturada. Así, de forma muy temprana surgió la iniciativa del Laboratorio COVID-19 en la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Este proyecto, liderado por un grupo de científicos comprometidos con la salud pública, se enfocó en la realización de pruebas PCR para la detección del virus en residencias de la Comunidad de Madrid. Un elemento clave para el éxito de esta iniciativa fue contar con multidisciplinariedad del conocimiento e infraestructuras de investigación adecuadas. Participaron expertos en salud pública, epidemiología, biología molecular, enfermedades infecciosas, bioseguridad, informática, genómica humana y de microorganismos, y así un largo etcétera. Ello convirtió a la universidad en un gran laboratorio coordinado donde, a través de sistemas de contención biológica, laboratorios de PCR y de genómica y el diseño de software ad hoc para la recepción, anonimización, trazabilidad, análisis, control de calidad y gestión de la información, pudieron ofrecerse diariamente los resultados de las personas infectadas en las residencias, fundamentalmente de mayores, para facilitar los correspondientes aislamientos y la gestión de espacios. No había suficiente capacidad en la sanidad pública para proporcionar este servicio diagnóstico a estos centros para la gestión sanitaria tanto de su personal como de sus residentes. En los 3 meses de confinamiento por el estado de alarma se analizaron, con esta iniciativa nacida en la Universidad Complutense de Madrid, cerca de 30.000 muestras en unas 250 residencias.

Tras el éxito de aquella iniciativa, desde diciembre de 2020 se organizó un laboratorio denominado COVID-LOT que sigue en funcionamiento para el control del personal universitario. COVID-LOT es una iniciativa, financiada en principio por la Universidad Complutense de Madrid y después por la Comunidad de Madrid, que identifica posibles brotes de COVID-19 en la comunidad universitaria mediante el rastreo en muestras de saliva agrupadas por lotes con un sistema analítico propio. Los análisis se hacen semanalmente y los resultados permiten identificar a las personas que son portadoras del SARS-CoV-2. Si no se detecta el virus en un lote, se considera seguro y se notifica como tal. En caso contrario, se examinan las muestras individuales para identificar a la persona potencialmente infectada por el virus. La iniciativa busca garantizar un entorno seguro en las actividades presenciales de la universidad y representa una sonda de la situación de transmisión del virus en la Comunidad de Madrid. En este número se ha incluido un artículo específico sobre COVID-LOT como sistema innovador y adaptable de rastreo de enfermedades infecciosas transmisibles en comunidades.

Con la finalidad de promover la integración de sus científicos y académicos en la resolución de las crisis sociales, la Universidad Complutense de Madrid, como continuidad de sus actividades durante la pandemia de COVID-19 y siendo parte de su vocación el hacer una ciencia abierta, fiable, eficiente y relevante para la sociedad, ha puesto en marcha su Programa ANTICIPA UCM. Con ello, esta universidad quiere situarse a la vanguardia de la ciencia abierta y cooperativa con su entorno social, para estimular y facilitar en los científicos complutenses la puesta en práctica de sinergias para investigar el virus SARS-CoV-2 y la

pandemia COVID-19, así como también sus nocivos efectos sobre las personas y los colectivos. ANTICIPA UCM es un proyecto multidisciplinar de investigación aplicada que agrupa 7 subproyectos con enfoques cooperativos para aportar conocimientos nuevos en el campo de la infección por SARS-CoV-2 y de la pandemia por COVID-19. Conjuga iniciativas en marcha en la UCM e incide en el desarrollo de técnicas y de nuevos productos diagnósticos, preventivos y terapéuticos, así como de modelos epidemiológicos que permitan el control de la pandemia y dotar al mismo tiempo de servicios de alerta temprana y de resiliencia a la comunidad y a los colectivos del entorno. El proyecto pretende materializar a corto plazo los resultados obtenidos hasta la fecha por 43 grupos de investigación que cooperan sinérgicamente para proporcionar tanto al mercado como a la sociedad, productos y servicios concretos de rápida aplicación a COVID-19 y a futuras pandemias.

Las tres iniciativas, el Laboratorio COVID-19 UCM a la que siguió la de COVID-LOT y finalmente la de ANTICIPA UCM, son un ejemplo de cómo la ciencia cooperativa, liderada por expertos comprometidos con la salud, puede ser la punta de lanza en momentos críticos, demostrando que, tanto en la vida como en la ciencia, la cooperación es esencial para alcanzar grandes logros.

En este número especial, se presentan artículos relacionados con las posibilidades que tiene la Universidad Complutense como conjunto para avanzar y desarrollar el conocimiento resolviendo, de esta forma, problemas sociales complejos mientras ofrece su potencial y oportunidad para cooperar con empresas e instituciones.





### José Manuel Bautista Santa Cruz

jmbau@ucm.es Universidad Complutense de Madrid

# Ciencia cooperativa. Impulsar la colaboración para el avance del conocimiento y la resolución de problemas complejos

a ciencia se basa en la búsqueda constante del conocimiento para la comprensión del mundo. A lo largo de la historia, los científicos han trabajado en solitario o en equipos más o menos numerosos para investigar, realizar descubrimientos y desarrollar teorías que han transformado la forma de entender el universo. Sin embargo, en los últimos años, ha surgido un enfoque cada vez más prominente en la comunidad científica: la ciencia cooperativa.

La ciencia cooperativa es un enfoque de investigación que se centra en la colaboración y la interdependencia entre científicos y comunidades. En lugar de ser una disciplina aislada motivada por la curiosidad individual, la ciencia cooperativa promueve el trabajo en equipo y la comunicación abierta para abordar problemas complejos y lograr resultados significativos. Más específicamente, se trata de la colaboración y cooperación entre científicos, instituciones y países para abordar retos complicados, llevar a cabo investigaciones de vanguardia y acelerar el avance del conocimiento en áreas básicas. A diferencia del enfoque tradicional de la ciencia competitiva, en la que los investigadores trabajan de manera individual o en pequeños grupos en busca de reconocimiento y financiación, la ciencia cooperativa promueve la colaboración abierta, el intercambio de ideas y datos sin un protagonismo individual, y con la construcción de una comunidad científica global que trabaja en conjunto para resolver los desafíos más apremiantes de este tiempo.

La idea de una ciencia cooperativa se basa en la premisa de que la colaboración y la concurrencia multidisciplinar son fundamentales para el progreso científico. A través de la colaboración, los científicos combinan su experiencia y conocimientos para abordar problemas complejos que requieren una variedad de enfoques y habilidades multidisciplinares. Al trabajar en equipos amplios, los investigadores acceden a una mayor cantidad de recursos, datos y tecnologías, lo que les permite desarrollar investigaciones más completas y rigurosas. Además, también implica la participación de las comunidades locales en la investigación científica. En lugar de ser meros observadores, las comunidades pueden contribuir a la investigación al compartir su conocimiento local, su interés específico en búsqueda de soluciones locales y al aportar sus propias experiencias. Esto contribuye significativamente a garantizar que los resultados de la investigación sean relevantes y aplicables a la vida cotidiana de personas y comunidades.

### Compartir para avanzar

Un aspecto clave de la ciencia cooperativa es el intercambio abierto de ideas y datos. Los científicos que colaboran comparten sus conocimientos, resultados e ideas de investigación de manera abierta y transparente, lo que permite una retroalimentación constante y una mejora continua. Esto fomenta la construcción de conocimiento en comunidad y evita la duplicación de esfuerzos, ya que otros científicos pueden construir sobre los avances previos y mejorarlos. Además, el in-

tercambio abierto de datos y resultados promueve la replicabilidad y la transparencia en la investigación, lo que fortalece la confiabilidad y la validez de los hallazgos científicos. La ciencia cooperativa también promueve la construcción de redes y alianzas a nivel local, regional e internacional. Los científicos colaboran con colegas de diferentes instituciones, países y culturas para ampliar su perspectiva y acceder a diferentes enfoques científicos. Esto permite una mayor diversidad en la investigación, conduciendo a soluciones más innovadoras y también más efectivas en cuanto a resolver desafíos importantes y de amplia relevancia social.

Es indudable que la ciencia ha jugado un papel crucial en construir el mundo tal como es ahora. Los avances científicos han sido responsables de algunas de las mejoras más significativas de la humanidad en campos como la medicina, la tecnología, la industria, la agricultura y la energía. Sin embargo, también es cierto que la ciencia a menudo se enfrenta a una serie de desafíos que pueden retrasar su capacidad para resolver problemas críticos. Uno de estos desafíos es el propio protagonismo que se le da al autor de un descubrimiento científico y su valorización en forma de índices para su evaluación, eventual promoción y progreso de la carrera científica. En otras palabras, la tendencia a centrarse en el trabajo individual y la competitividad en lugar de la colaboración y la cooperación por el propio beneficio del individuo. Este enfoque tiene su efecto sobre el

retraso en el descubrimiento de mayor interés, al centrarse en lo fácilmente alcanzable y en una fragmentación de la innovación, lo que a la larga impide que la ciencia alcance todo su potencial de desarrollo.

Quizás es momento de reconocer abiertamente que la ciencia no debería ser una actividad individual. De hecho, debe ser más un esfuerzo colectivo que se base en la colaboración y la cooperación. Los científicos trabajan juntos para resolver problemas complejos y descubrir nuevos conocimientos. Sin embargo, en muchos casos, la cultura científica se ha centrado en la competencia individual, donde cada científico se aísla en su propio trabajo tratando de competir para destacar por encima de otros científicos de su campo a los que considera competidores. Cuando los científicos trabajan en islas, sin compartir de forma inmediata la información ni colaborar con otros, es menos probable que descubran soluciones innovadoras a problemas complejos. En lugar de eso, se produce una duplicación de esfuerzos, a veces aplicados a problemas más cómodos de resolver, lo que significa que los mismos problemas se abordan una y otra vez o de forma simultánea en el tiempo con la consiguiente pérdida de potencial. Además, el enfoque en la competencia individual también conduce a un sesgo en la investigación. Los científicos están más preocupados por publicar artículos en revistas científicas prestigiosas que por encontrar soluciones efectivas a los problemas reales. Esto centra la investigación en



elementos que son más fáciles de investigar, en lugar de abordar los problemas más críticos a los que se enfrenta la sociedad.

Existen varios ejemplos clásicos de duplicación de esfuerzos científicos que han alcanzado soluciones similares de forma aislada. Charles Darwin no fue el único científico que estaba interesado en la evolución biológica. Alfred Russel Wallace, un naturalista británico, también estaba trabajando en una teoría similar en el mismo momento en que Darwin estaba desarrollando la suya. De hecho, Wallace llegó a enviar su teoría a Darwin para que la revisara antes de publicarla. Esto es una historia interesante porque estimuló a Darwin a proponer su teoría. Así, aunque ambos científicos llegaron a conclusiones similares, Darwin es el recordado como padre de la Teoría de la Evolución. Otro ejemplo es el de la telegrafía sin hilos, donde Guglielmo Marconi es acreditado a menudo como el inventor de la radio, aunque no fue el único científico trabajando en la transmisión inalámbrica de señales. Nikola Tesla también, trabajando en este área al mismo tiempo, había solicitado varias patentes sobre la transmisión de energía y de señales inalámbricas antes de que Marconi presentara su patente en 1901.

En estos casos, la duplicación de esfuerzos científicos llevó a soluciones similares. Pero también la duplicación de esfuerzos ha conducido a desastres por asumir riesgos en la carrera de la competitividad como los casos del Apolo-1 en enero de 1967 y del Soyuz-1 tres meses después, en abril de ese mismo año, durante la Guerra Fría entre Estados Unidos y la Unión Soviética. Sus programas espaciales paralelos condujeron a una competencia intensa para ser los primeros en llegar a la Luna, en lugar de una cooperación y colaboración que podrían haber llevado a una solución más rápida y efectiva.

#### El Proyecto del Genoma Humano fue cooperativo

Hay múltiples ejemplos de éxito de ciencia cooperativa que deberían ser guías para gobiernos y entidades financiadoras, tanto por la idea como por su desarrollo posterior. El Proyecto del Genoma Humano, completado en 2003, fue el resultado del trabajo de muchos grupos de investigación que colaboraron para descubrir la secuencia completa del ADN humano, y cuya ampliación y avance ha florecido en nuevas tecnologías que ahora siguen revolucionando el campo de la genómica. Otro ejemplo reciente es el desarrollo de la vacuna contra el COVID-19, resultado de la colaboración entre muchas empresas farmacéuticas y también con empresas de otros sectores -como la de elaboración de las ampollas de cristal para su envasado; o las de transporte y distribución- junto a organizaciones de investigación privadas y estatales. Las ideas y la información estaban ahí, pero se necesitaba la participación de muchos otros actores que se pusieron en marcha en un tiempo récord para fabricar y distribuir las vacunas.

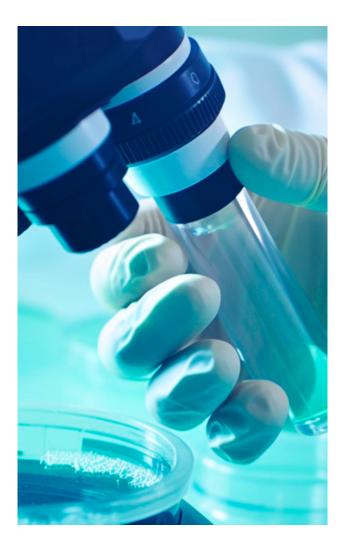
La cooperación científica tiene así el potencial de abordar los desafíos realmente complejos a los que se enfrenta la sociedad. Frenar el cambio climático requiere la colaboración de científicos de muchas y muy diversas disciplinas y además de diferentes partes del mundo para abordarlo y comprenderlo de manera efectiva. Solo la cooperación científica ayuda a resolver problemas globales en áreas como la energía, la agricultura o la salud.

Ahora mismo, uno de los ejemplos más destacados de ciencia cooperativa es la investigación espacial en la que participan diversos países e instituciones. La exploración del espacio requiere la colaboración entre naciones para desarrollar tecnologías muy avanzadas, compartir datos y recursos, y trabajar en conjunto en proyectos de gran envergadura. Es, de hecho, un área en la que la ciencia cooperativa ha sido fundamental para el avance del conocimiento y el logro de grandes hitos. La Estación Espacial Internacional (EEI) es una colaboración entre varios países, incluyendo Estados Unidos, Rusia, Canadá, Japón y los europeos. La estación ha permitido la realización de investigaciones científicas en el espacio, como estudios sobre la fisiología humana en condiciones de microgravedad, el comportamiento de materiales en el espacio y la observación de la Tierra desde el espacio. Además, la EEI ha servido como plataforma para la cooperación entre astronautas de diferentes países. Otro caso de éxito es la Misión Espacial Rosetta, que lanzada en 2004 como colaboración entre la Agencia Espacial Europea (ESA) y la Agencia Espacial Alemana (DLR) envió una sonda a estudiar el cometa 67P/Churyumov-Gerasimenko. La misión implicó la construcción de una nave espacial y el desarrollo de tecnologías avanzadas para el aterrizaje en el cometa. La sonda envió datos a la Tierra durante dos años y medio, lo que permitió a los científicos estudiar la composición y evolución del cometa y además descartar la hipótesis aceptada, que se consideraba universal, sobre el papel de los campos magnéticos en la formación del sistema solar. También el Observatorio Chandra de rayos X es una colabora-

ción entre la NASA y agencias espaciales de varios países, incluyendo Canadá, Japón y los europeos que ha permitido estudiar fenómenos como agujeros negros, supernovas y cúmulos de galaxias. Otro buen ejemplo de cooperatividad científica se aplica al Telescopio Espacial Hubble, entre la NASA y la Agencia Espacial Europea (ESA). Por no hablar del mucho más reciente telescopio James Webb, también fruto de la colaboración de 14 países y operado por las mismas dos agencias espaciales ya mencionadas. El telescopio ha permitido la observación de objetos celestes en diferentes longitudes de onda, aportando datos esenciales para estudiar la formación de las galaxias, el universo temprano y la materia oscura. Todo esto no solo ha permitido el desarrollo de tecnologías avanzadas y la realización de investigaciones científicas en el espacio, sino que también han transformado la comprensión del universo.

#### Vacunas: lección de cooperación

La ciencia cooperativa es también fundamental para abordar problemas importantes de salud pública en todo el mundo. Ya se ha mencionado antes que las va-



cunas contra COVID-19 fueron fruto de una amplia, rápida e inmediata cooperación público-privada de múltiples sectores. Es precisamente en la pandemia del COVID-19 donde más se ha puesto de manifiesto la importancia de la cooperación científica global. Desde el inicio de la pandemia, investigadores de todo el mundo han colaborado para desarrollar y distribuir métodos diagnósticos y vacunas eficaces contra el virus. La cooperación ha incluido la compartición de datos genómicos, la realización de ensayos clínicos en múltiples países y la producción y distribución de vacunas a nivel mundial.

Pero este hito tan reciente no es el único. La viruela, que fue una de las enfermedades más mortales de la historia, fue erradicada gracias a una campaña global de vacunación que involucró la colaboración de múltiples países e instituciones. La Organización Mundial de la Salud (OMS) coordinó la campaña y los gobiernos de todo el mundo contribuyeron con fondos y personal para administrar las vacunas. El 8 de mayo de 1980 la Asamblea Mundial de la Salud declaró oficialmente que la viruela había sido erradicada del mundo. Otra enfermedad que ha cambiado la forma de entender la cooperación es el VIH/SIDA. La investigación sobre el VIH/SIDA ha sido el resultado de una colaboración global. Científicos y empresas farmacéuticas han trabajado para desarrollar tratamientos y terapias para las personas que viven con VIH/SIDA, así como para prevenir la propagación del virus. Los ensayos clínicos se han realizado en múltiples países y los resultados se han compartido en todo el mundo. Ahora mismo contraer VIH/SIDA no significa una sentencia de muerte. y esto ha sido conseguido en tan solo 30 años. Quizás la lucha contra la malaria también pueda ser en el futuro un modelo de ciencia cooperativa. Para ello, deberá unificarse y coordinarse el trabajo científico para desarrollar nuevas terapias y vacunas realmente eficaces, así como para detectar portadores asintomáticos, proporcionar tratamiento, distribuir mosquiteras y repelentes de mosquitos en zonas afectadas y para eliminar el ciclo de pobreza basal asociada a los que más padecen la enfermedad.

Mientras tanto, la investigación sobre el cáncer está cambiando la enfermedad de forma similar a como ocurrió con el VIH/SIDA. La investigación sistemática, amplia y en múltiples frentes en colaboración con empresas farmacéuticas está dando lugar a nuevos tratamientos y una prevención más eficaz gracias a la mejor comprensión de la enfermedad y al desarrollo de estrategias terapéuticas rompedoras como es la inmunoterapia. Ensayos clínicos y estudios genómicos del cáncer realizados en consorcios científicos y clínicos en múltiples países han resultado en protocolos universales para el tratamiento de cada tipo de cáncer que ya no siempre son tan mortíferos. La lucha contra el COVID-19, viruela y cáncer son modelos que reflejan la importancia de la ciencia cooperativa en la resolución de problemas importantes de salud pública. La colaboración entre ciencia, industrias e instituciones ha permitido el desarrollo de tratamientos y terapias eficaces para enfermedades mortales y ha transformado la forma en que se abordan algunos desafíos de salud.

#### Cambio climático

El medio ambiente es un área donde también la ciencia cooperativa se hace fundamental para comprender mejor las causas y los efectos del cambio climático, así como para desarrollar soluciones dirigidas a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) promueve la colaboración científica global en este campo, en el que cientos de científicos de todo el mundo trabajan juntos para producir informes y recomendaciones sobre el cambio climático. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) es una colaboración internacional en el campo de la contaminación del agua, en el que los países trabajan juntos para desarrollar políticas y estrategias específicas. La ciencia cooperativa tiene un gran papel para comprender de forma global la contaminación del agua y de los acuíferos, lo que permite desarrollar soluciones que protegen este recurso vital. También la Convención sobre la Diversidad Biológica es un modelo de colaboración internacional para la conservación de la biodiversidad, cuya pérdida es otro problema ambiental global importante. En esta iniciativa los países trabajan juntos para desarrollar estrategias y políticas de protección de la biodiversidad mediante programas específicos como el de Áreas Protegidas, que tuvo como objetivo proteger al menos el 17% de las zonas terrestres y el 10% de las zonas marinas para el año 2020; o el Programa de Acción sobre la Biodiversidad Agrícola, que, basado en datos científicos, cuida de la diversidad de cultivos y animales de granja, además de promover la adopción de prácticas agrícolas sostenibles y la protección de las variedades locales de cultivos y razas de animales bien adaptadas localmente.

La mayoría de estas ideas organizativas cooperativas tienen ya décadas de actividad y en muchos casos parten

de iniciativas de organismos interestatales como es la ONU, o bien es la misma ONU quien se hace depositaria de tales iniciativas. Aportar estabilidad es un elemento importante en su durabilidad y en el potencial efecto a largo plazo de las iniciativas. Así también, la gestión de residuos supone también un problema ambiental global que afecta a la calidad del aire y del agua, así como al de la salud de personas y ecosistemas ha sido liderado por la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI), de forma que son las naciones quienes -a partir de desarrollos científicos y tecnológicos- enfocan y desarrollan estrategias y políticas. Sin duda, la cooperación científica o técnica global ha sido fundamental para desarrollar soluciones al problema de los residuos, empezando por su reducción, la reutilización y el reciclaje. Estos problemas globales requieren cuanto menos la colaboración entre países e instituciones para desarrollar e implementar soluciones innovadoras y eficaces que protejan el planeta y garanticen su sostenibilidad a las siguientes generaciones.

No se debe dejar de mencionar también la cooperación científica o técnica como elemento de avance en el campo de las energías, desde la investigación y el desarrollo de tecnologías de energías renovables hasta la mejora de la eficiencia energética y la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero. La cooperación científica ha permitido importantes avances en energías renovables, como son la solar, la eólica, la hidroeléctrica o la geotérmica. El proyecto DESERTEC es un consorcio internacional que tiene como objetivo generar electricidad a partir de energía solar en el desierto del Sahara y distribuirla en Europa. El proyecto cuenta con la colaboración de varios países europeos y africanos, así como de empresas privadas. Sin empresas que colaboren con la ciencia por su potencial de desarrollo tecnológico y económico no es posible lanzar estas iniciativas tan importantes. Y en este camino están también los nuevos sistemas de almacenamiento de energía, donde la cooperación científica desarrolla tecnologías como baterías y sistemas de almacenamiento de hidrógeno. Un ejemplo es el proyecto europeo HySTOC, que busca el almacenamiento de hidrógeno a gran escala para permitir la integración de energías renovables intermitentes en la red eléctrica. Es precisamente el uso versátil y temporal de los recursos energéticos en red donde tiene lugar también una mejora de la eficiencia energética. Es aquí donde se ha centrado la cooperación científica dirigida a mejorar la eficiencia energética en edificios, vehículos y otros sistemas energéticos. Los proyectos "Smart

Grids" buscan desarrollar redes eléctricas inteligentes que permitan una mayor integración de energías renovables y una mejor gestión de la demanda energética.

#### Aportación de las ciencias sociales

Las ciencias sociales también participan de esta revolución cooperativa. El desarrollo sostenible no se puede abordar sin una investigación globalizada, pues es donde más se requiere la cooperación entre países y muchas disciplinas. La Agenda 2030 de las Naciones Unidas ha establecido 17 objetivos de desarrollo sostenible alentando la cooperación científico-técnica global para lograr estos objetivos. En la lucha contra la violencia de género en América Latina participan muchas organizaciones locales y grupos de investigación que buscan una comprensión y colaboración multidisciplinar para desarrollar estrategias efectivas de prevención y tratamiento de la violencia de género, incluyendo la creación de refugios para mujeres y programas de capacitación para los funcionarios encargados de hacer cumplir la ley. También en Japón, para la recuperación post-tsunami en 2011, los científicos sociales japoneses se unieron con los grupos locales para desarrollar planes de recuperación y reconstrucción. Juntos, han trabajado en la creación de comunidades más resilientes y en la preparación frente a otros potenciales desastres.

Otro ejemplo de la ciencia cooperativa es la reducción de la pobreza a través del Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola (FIDA). El FIDA trabaja desde 1977 en colaboración con gobiernos y comunidades rurales para reducir tanto la pobreza como la inseguridad alimentaria en las zonas rurales de países de renta baja. El FIDA financia proyectos que ayudan a las comunidades rurales a desarrollar sus recursos naturales y mejorar sus sistemas agrícolas, aumentando así sus ingresos y mejorando su calidad de vida.

#### Lucha contra la pobreza

Pero en la lucha contra la pobreza existen además factores sociales que requieren de estudios experimentales cooperativos. Desde esta perspectiva, los economistas Abhijit Banerjee, Esther Duflo y Michael Kremer han llevado a cabo investigaciones innovadoras para abordar la pobreza en diferentes partes del mundo. Su enfoque se centra en la realización de estudios de campo interdisciplinares para evaluar la eficacia de diferentes intervenciones y programas destinados a reducir la pobreza. Una de las principales contribuciones de estos economistas ha sido su enfoque riguroso basado

en datos para optar por iniciativas eficaces. Utilizando métodos experimentales evalúan diferentes intervenciones en el campo de la educación, la salud, la nutrición o la microfinanciación. En un estudio realizado en India evaluaron la eficacia de un programa de tutoría escolar para mejorar el aprovechamiento de los estudios, revelando su impacto positivo en el rendimiento académico, especialmente en aquellos con previo menor rendimiento. Este enfoque experimental de una iniciativa social también se ha aplicado en un estudio sobre microfinanciación en Marruecos, donde se evaluaron los efectos de préstamos a mujeres en cuanto a creación de empresas y aumento de los ingresos familiares, mostrando su impacto positivo en ambos criterios. En general, el enfoque experimental de Banerjee, Duflo y Kremer para abordar la pobreza ha sido muy influyente en el campo de la economía del desarrollo. Sus investigaciones han proporcionado una base sólida para el diseño de políticas públicas y programas destinados a reducir la pobreza. Además, han ayudado a fomentar una cultura de evaluación científica basada en datos multidisciplinares en el campo del desarrollo social, lo que ha llevado a una mayor transparencia y responsabilidad en la implementación de políticas públicas con programas eficaces destinados a combatir la pobreza.

Esta idea de cooperación científica de Banerjee, Duflo y Kremer con orientación empírica también ha sido utilizada para aliviar la malaria en zonas endémicas rurales centrándose en la realización de estudios de campo para evaluar la eficacia de diferentes intervenciones y programas de prevención y tratamiento de la enfermedad. En un estudio realizado en Kenia, estos científicos, con un gran equipo multidisciplinar, evaluaron la eficacia de la distribución gratuita de redes mosquiteras tratadas con insecticida para prevenir la malaria. La distribución a un coste mínimo en lugar de gratuita de redes mosquiteras tuvo un impacto positivo en la reducción de la malaria en la población salvando así la vida de un buen número de niños menores de cinco años. También en el estudio sobre el uso de terapias combinadas para tratar la malaria en Uganda observaron un efecto positivo en la reducción de la malaria en la población en general, pero con resultados especialmente eficientes en mujeres embarazadas, lo que ha llevado a su implementación en este segmento más vulnerable de la población en muchas otras partes de África.



En general, los enfoques experimentales de Banerjee, Duflo y Kremer han sido muy influyentes en el campo de la salud global. Por este tipo de aproximaciones multidisciplinares y de evaluación de las medidas que contribuyen a eliminar la pobreza fueron distinguidos en el año 2019 con el Premio Nobel de Economía.

#### Ciencia cooperativa experimental

Los ejemplos anteriores muestran la importancia de una ciencia cooperativa y experimental en la resolución de problemas relevantes en numerosos ámbitos de importancia social. El enorme avance en la secuenciación del genoma humano no hubiera sido posible con el mismo número de científicos trabajando independientemente cada uno en su laboratorio sin una organización y comunicación intensa. Lo mismo ocurre en los ejemplos de los proyectos internacionales de exploración espacial que han tenido éxito por haber sido cooperativos. La perspectiva es buscar nuevas dinámicas de la investigación cooperativa por su potencial para adoptar una función de mejora y ampliación del conocimiento básico, así como para proporcionar elementos de justicia social allí donde hacen falta y de una manera esperanzadora. Es claro que la ciencia cooperativa ha permitido avances significativos en la lucha contra la enfermedad y contra la pobreza y a favor de un mundo más sostenible. No se debe olvidar que la cooperatividad no solo es muy útil para abordar amplias incógnitas de ciencia básica, como las relacionadas con la evolución de los genomas, la materia oscura

o la aparición de la vida en la Tierra, sino que este conocimiento adquirido acaba repercutiendo en soluciones científico-técnicas a medio o largo plazo. Para abordar desafíos globales, la colaboración ya no será entre un científico y otro científico sino entre redes de científicos y entre empresas, países e instituciones para desarrollar soluciones innovadoras y efectivas. A medida que la ciencia cooperativa continúa evolucionando, se espera que se logren más avances sociales con una mejora sustancial de los valores humanos que promueven estas mismas iniciativas.

A través de la colaboración multidisciplinar se aprovechan las fortalezas de diferentes áreas de conocimiento para lograr avances significativos en la investigación y el desarrollo. Las redes de científicos multidisciplinares son esenciales para la ciencia cooperativa, ya que permiten la colaboración entre expertos de diferentes disciplinas. En el campo de la biotecnología, la colaboración entre biólogos, químicos, ingenieros y expertos en biología computacional ha traído importantes avances en nuevas terapias y medicamentos.

### No solo científicos

Las empresas también desempeñan un papel importante en la ciencia cooperativa, ya que a menudo disponen de los recursos y la experiencia necesarios para llevar nuevas tecnologías al mercado. A través de la colaboración con científicos y académicos, las empresas pueden identificar nuevas oportunidades

de investigación y desarrollo, y trabajar en estrecha colaboración para llevar soluciones al mercado con su amplio potencial de distribución. Esta cooperatividad empresa-ciencia supone un buen puñado de ventajas, como es el acceso a nuevos conocimientos y tecnologías que les permite mejorar su eficiencia y competitividad. Pero también las empresas que participan en proyectos científicos, al estar en la vanguardia del conocimiento en su campo, inspiran ideas y enfoques innovadores para resolver los propios problemas de las empresas. Ello incluye el campo de la comunicación la empresa mejora su imagen y reputación en el mercado al percibirse como una señal de que es innovadora y comprometida con el progreso. Finalmente el enfoque cooperativo ofrece a las empresas también dos ventajas económicas. Por un lado, la posibilidad de obtener financiación por tener acceso a recursos públicos que les permiten llevar a cabo investigaciones y proyectos que de otra manera no podrían realizar. Y, por otra parte, ayuda a reducir costes, pues al trabajar con expertos se evitan errores y se mejora la eficiencia de sus procesos.

Los países e instituciones también son importantes para la ciencia cooperativa, ya que proporcionan financiación, recursos y acceso a infraestructuras y datos. Los programas de financiación y colaboración internacional, como el Programa Horizonte 2020 de la Unión Europea o la Iniciativa de Ciencia y Tecnología del Pacífico Asiático, aunque de forma limitada y no siempre identificando dianas específicas, fomentan la cooperación entre países y regiones para lograr avances significativos de investigación y desarrollo.

En la ciencia cooperativa, las interacciones entre redes interdisciplinares de científicos, empresas, países e instituciones son fundamentales para el éxito. La colaboración de múltiples disciplinas de investigación, también sociales, humanísticas y legislativas permite abordar problemas complejos desde diferentes perspectivas, mientras que la colaboración entre empresas, países e instituciones facilita la coordinación y el acceso a recursos y datos críticos.

Muchos de los problemas más acuciantes a los que se enfrenta la humanidad requieren un enfoque más cooperativo por parte de la ciencia. La lucha contra el cambio climático, las enfermedades de la pobreza y otras también graves sin terapia actual, el desarrollo de energías limpias y renovables, entre otros, son desafíos que requieren la cooperación y coordinación de múltiples disciplinas y actores.

El cambio hacia una ciencia cooperativa ofrece grandes beneficios. Impulsará la innovación y la creatividad al fomentar la diversidad de perspectivas y enfoques. Al involucrar a múltiples investigadores con distintos conocimientos y habilidades, los proyectos científicos pueden abordar problemas desde diferentes ángulos, lo que conducirá a soluciones más sólidas y eficaces.

### Eficiencia y confianza

Por otra parte, la ciencia cooperativa aumenta la eficiencia y reduce los costes. La investigación individual es costosa y limitada en cuanto a recursos y capacidades. Al trabajar en conjunto, los investigadores comparten recursos y colaboran y aumentan la productividad para la resolución del problema.

Otro aspecto destacable es que la ciencia cooperativa es más inclusiva y equitativa. La investigación individual excluye a investigadores de bajo presupuesto o de regiones menos desarrolladas. La cooperación científica permite que investigadores de todo el mundo colaboren y contribuyan a la solución de problemas importantes, sin importar su origen o recursos.

La ciencia cooperativa -por su propia estructura- fomenta la transparencia y la comunicación. Los proyectos científicos pueden ser complejos y difíciles de entender para el público en general. La colaboración científica involucra a las múltiples partes interesadas y promueve mayor comunicación y divulgación de los resultados, lo que aumenta la confianza pública en la ciencia.

### Cambio de paradigma

Una ciencia cooperativa más universal supone un cambio de paradigma social y político para abordar los desafíos actuales a los que se enfrenta la humanidad. La cooperación científica impulsa la innovación, aumenta la eficiencia, es más inclusiva y equitativa, y fomenta la transparencia y la comunicación. Esta es la ciencia que verán crecer las nuevas generaciones de investigadores. Cuanto más rápido se camine en esta senda de ampliar los enfoques cooperativos para resolver los desafíos más acuciantes, antes se estará en disposición de superarlos. Es ya momento de que gobiernos e instituciones científicas y académicas, como las universidades y los centros de investigación -especialmente los públicos- tomen decisiones valientes en este sentido y sean conscientes de que sustituir la competitividad por la cooperación es la clave de un mundo mejor.

# **COVID-LOT:** proyecto cooperativo universitario para la prospección preventiva de infectividad en grandes colectivos



Jesús Pérez Gil

jperezgi@ucm.es

Coordinador del Provecto COVID-LOT. Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular (UCM)



Javier Arroyo Nombela

jarroyo@farm.ucm.es

Director de la Unidad de Genómica (UCM). Catedrático de Microbiología



José Manuel Bautista Santa Cruz

imbau@ucm.es

Coordinador del Proyecto ANTICIPA UCM v de los laboratorios COVID UCM. Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

legado el verano del año 2020, las universidades españolas y madrileñas se preparaban para el retorno a las actividades académicas presenciales en septiembre, ante el comienzo del curso 2020-21. Había quedado atrás un confinamiento sin precedentes, que obligó a todas las universidades, y por supuesto a la Universidad Complutense, a implementar, en tiempo récord y condiciones muy complejas, un modo nuevo de completar las actividades académicas del curso 2019-2020, principalmente mediante el desarrollo de docencia telemática.

Todo ello supuso la puesta en marcha de infraestructura digital y la iniciación de muchos estudiantes y profesores en procedimientos hasta ese momento inéditos. Aún con las enormes dificultades que ello impuso, y gracias a la actitud y esfuerzo de todo el colectivo universitario, el curso pudo completarse. Sin embargo, se hizo también evidente la imperiosa necesidad de retornar a las actividades formativas e investigadoras presenciales, sin las cuales la universidad no estaba en disposición de cumplir con sus objetivos de una forma eficiente.

El reto era gigantesco, pues requería volver a poner en contacto directo a una enorme población, formada en gran medida por personas aún no protegidas por vacuna alguna, y potencialmente reuniendo amplios segmentos de jóvenes con frecuencias significativas de infección asintomática y de personal altamente vulnerable por edad y condición.

#### El contexto del momento y la complejidad del reto

La Universidad Complutense había puesto en marcha, en el primer semestre de 2020, con el esfuerzo y la determinación de un importante número de profesores, investigadores, técnicos y estudiantes, una iniciativa única que reunió experiencia y capacidad investigadora, infraestructura y versatilidad de los servicios, para ofrecer la posibilidad de analizar la infectividad COVID en las personas de las residencias de mayores de la Comunidad de Madrid.

Ello supuso un verdadero cambio de paradigma: poner en juego, de forma cooperativa, capacidades hasta ese momento dispersas en la universidad, con un objetivo superior ligado a una emergencia social. La universidad al servicio de la sociedad, la investigación, las capacidades científicas y los servicios, coordinándose de forma innovadora por un bien común. Muchas personas, desde las autoridades encargadas de la gestión al máximo nivel hasta el personal téc-









Sala logística de muestras del Programa COVID-LOT

Se muestran detalles del espacio de procesamiento de muestras y preparación de lotes, con condiciones de bioseguridad BSL-2, las estanterías de almacenaje de cajas y viales de muestras de saliva y del proceso de registro en la aplicación informática de muestras recogidas.

nico o investigador de base, experimentaron en ese periodo un cambio trascendental en su percepción de la misión social de la universidad, como depositaria de conocimiento y capacidades que la sociedad tarde o temprano necesita.

En ese contexto, en agosto de 2020, emergió desde ese mismo colectivo comprometido, la idea de desarrollar un proyecto que reenfocara las capacidades de análisis coordinadas inicialmente para atender a las residencias, para abordar un problema de complejidad diferente, aunque no menor: prevenir la aparición de brotes de infectividad COVID como consecuencia del desarrollo de las actividades académicas presenciales.

Para cumplir con este objetivo se preveían cuatro puntos clave en el desarrollo del proyecto:

1. Desarrollar y validar un método analítico alternativo para la detección de la presencia del virus SARS-CoV-2, que simplificara mucho la necesidad de aplicar el método de PCR que había venido utilizándose sobre muestras de RNA viral que debía ser previamente purificado. Se trataba de simplificar el procesamiento complejo de muestras

con un coste en recursos relativamente elevado y con restricciones derivadas de la necesidad de utilizar entornos de bioseguridad suficiente. También eran condiciones de contorno indispensables la optimización de procedimientos de toma de muestra sencillos y generalizables, que prescindieran de la asistencia de personal sanitario, y una capacidad de escalado suficiente que permitiera tomar y analizar muestras de miles de personas cada semana.

- 2. Había que implementar capacidades logísticas en la universidad que posibilitaran la recogida, manipulación y gestión, en condiciones de bioseguridad adecuada, de miles de muestras semanales, recogidas de forma dispersa por los diferentes campus y centros de la Universidad Complutense.
- 3. También resultaba imprescindible desarrollar procedimientos de gestión de información que permitieran tratar los datos de carácter personal, tanto de las personas analizadas como del resultado de esos análisis, de forma segura, confidencial, trazable y automatizada, con acceso limitado a las estructuras de toma de decisión sobre el carácter presencial o no presencial de las actividades a desarrollar por personas y colectivos.
- 4. Por último, el operativo requería definir protocolos de actuación con instrucciones claras, coherentes y justificadas tanto para los diferentes responsables como para las personas analizadas, en virtud de los resultados y el seguimiento semanal del estado de infectividad de personas y colectivos.

Esta era la magnitud del desafío que fue necesario atender desde ese mes de agosto de 2020 en el que nació la idea, hasta diciembre del mismo año, cuando arrancó el Laboratorio de Análisis COVID-LOT de la Universidad Complutense.

### El método COVID-LOT: saliva y lotes

En mayo de 2023, resulta un procedimiento habitual y rutinario el autoanálisis de infectividad COVID por presencia de antígenos recogidos en un hisopo nasal por la propia persona que se analiza. Sin embargo, en el verano de 2020, la aplicación de hisopos nasales para la recogida de muestras analizables en la detección de virus mediante PCR requería la asistencia de personal sanitario, siempre debidamente protegido mediante los adecuados equipos de protección in-

dividual (EPI). Ello hacía en principio inviable una toma masiva de muestras en toda la Universidad Complutense. La idea clave que convirtió en viable el proyecto COVID-LOT fue la posibilidad de realizar los análisis directamente en muestras de saliva. Varias publicaciones que vieron la luz en julio-agosto de 2020 describían estudios que demostraban la posibilidad de detección de virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva de personas infectadas, a lo largo de todo su periodo de infección. El análisis de esas publicaciones permitió identificar las muestras de saliva como ideales para desarrollar un proyecto de prospección masiva en colectivos, pues abría la posibilidad de partir de un automuestreo en el que cada persona tomara su propia muestra sin peligro de exponer a otros a un posible contagio durante el proceso de toma de muestra. Quedaba por explorar si las muestras de saliva eran adecuadas para el proceso analítico de detección cuantitativa de la presencia de virus mediante PCR.

La segunda idea clave en la gestación del proyecto COVID-LOT provino del mundo veterinario, en el que el análisis masivo de cabañas ganaderas se ha desarrollado tradicionalmente mediante el procesamiento de un número ingente de muestras en un proceso llamado "por lotes". En este tipo de gestión de muestras, un número adecuado de muestras diferentes se reúnen y se analizan de forma "colectiva". Ello permite descartar la presencia de un patógeno en grupos relativamente grandes de individuos mediante un número de análisis limitado y razonable, en capacidades, recursos necesarios y coste. Surgió así la posibilidad de aplicar el concepto de análisis por lotes (de ahí el "-LOT" de la denominación del proyecto) al procesamiento de un número elevado de muestras a recoger del colectivo universitario. Se necesitaba, para completar el estudio de viabilidad, definir el número de muestras idóneo para aplicar un procesamiento por lotes de muestras de saliva a la detección de SARS-CoV-2.

Tanto en la puesta a punto del método de detección de SARS-CoV2 mediante PCR en saliva como en su aplicación a lotes de muestras, el papel fundamental correspondió a la Unidad de Genómica, perteneciente al CAI de Técnicas Biológicas de la Universidad Complutense, y sito en la Facultad de Ciencias Biológicas. Este servicio había desarrollado los análisis mediante RT-PCR cuantitativa de la presencia de RNA viral en muestras obtenidas mediante hisopos nasales de las personas de las residencias de mayores.

Estas muestras fueron procesadas entre los meses de marzo y junio de 2020 en los laboratorios con bioseguridad BSL-3 del Centro VISAVET de la Universidad Complutense, en la Facultad de Veterinaria, para el aislamiento de RNA que posteriormente era cuantificado de forma específica en la Unidad de Genómica y en otros laboratorios de PCR distribuidos en el campus.

Para poner a punto el método de análisis que finalmente permitió desarrollar COVID-LOT, el personal técnico de la Unidad de Genómica aplicó la detección cuantitativa mediante RT-PCR a muestras virales transferidas a saliva. Ello incluyó el desarrollo de un procedimiento de desactivación previa de la infectividad viral en las muestras mediante tratamiento por proteasas -que digieren proteínas de la envuelta del virus que son imprescindibles para su capacidad de infección- y por alta temperatura. Esta desactivación permitía transferir de forma segura las muestras al laboratorio de genómica, donde se puso a punto un método capaz de amplificar y cuantificar el RNA viral aun inmerso en el complejo entorno de la saliva, sin necesidad de pasar por el tedioso procedimiento de aislar primero el RNA del resto de componentes de saliva y virus. La viabilidad de esta aproximación había sido compartida en un repositorio público por un estudio de la Universidad de Yale (posteriormente publicado en Vogels et al., (2021) Med 2, 263-280). Los técnicos de la Unidad de Genómica determinaron que eran capaces de detectar, con el método puesto a punto en sus laboratorios, la presencia en saliva de solo 10 copias de RNA viral, correspondientes a la presencia de otras tantas partículas infectivas. Ello abría la oportunidad de la detección de virus en muestras muy diluidas, lo que ocurriría como consecuencia, por ejemplo, de mezclar una muestra de saliva de una persona infectada con muestras de saliva de otras personas no infectadas, en el eventual procesamiento por lotes. El análisis de infectividad en colectivos mediante muestras de saliva procesadas en lotes fue abordado también en esos días por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (ver Moreno-Contreras et al. (2020) J. Clin. Microbiol. 58, 301659-20). El trabajo de la UNAM y los experimentos de la Unidad de Genómica de la UCM permitieron establecer que el análisis de muestras de saliva agrupadas de 10 personas diferentes proporcionaba una sensibilidad óptima mientras reducía en 1 orden de magnitud el número total de análisis a desarrollar. Solo sería necesario analizar las muestras individuales correspondientes





# CovidLot: codificación de etiquetas BIO-030-C10-000365-043





### Recogida de muestras en el Programa COVID-LOT

Imágenes ilustrativas de la distribución de materiales, viales y cajas, para la recogida de muestras de COVID-LOT (arriba, izda.), recogida de muestras en los colegios mayores complutenses (arriba dcha.), codificación de etiquetas (abajo izda.), caja de muestras etiquetadas (abajo centro) y esquema ilustrativo en las instrucciones de recogida de muestras (abajo dcha.).

a aquellos lotes con resultado positivo para infectividad COVID-19.

La validación del método puesto a punto en la Unidad de Genómica de la UCM se completó mediante un proyecto colaborativo con participación del Hospital Puerta de Hierro y su Biobanco y del Hospital Infanta Sofía, ambos de Madrid, quienes recogieron simultáneamente muestras de saliva e hisopos nasales de pacientes derivados a los servicios de análisis hospitalarios. El análisis simultáneo de esas muestras tanto en los laboratorios de los hospitales como en los de la Universidad Complutense permitió determinar una concordancia superior al 90% entre la detección de infectividad mediante PCR directa en saliva y la detección en las muestras en hisopo que pasaban previamente por el aislamiento de RNA, tal y como estaba establecido el análisis estándar en contexto clínico.

### El desafío logístico

Una vez establecida la tecnología capaz de detectar, con sensibilidad, la presencia de virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva procesadas por lotes, la dificultad fundamental residía en implementar la estructura logística adecuada para recoger de forma controlada y registrada muestras de saliva de miles de personas del colectivo universitario, y movilizarlas y procesarlas en laboratorios dotados para ello. CO-VID-LOT arrancó como proyecto piloto en la Facultad de Ciencias Biológicas, en donde se encuentran localizados los laboratorios de la Unidad de Genómica de la UCM. Ello permitía poner a punto, de forma coordinada, tanto los procedimientos de toma

de muestra y de preparación de lotes como los de su análisis posterior.

La colaboración en el proyecto de la Facultad de Ciencias Biológicas hizo posible la conversión, en un tiempo mínimo, de un aula próxima a la Unidad de Genómica, en una sala logística de procesamiento de muestras. Esta sala se equipó con lo necesario para trabajar en un nivel de bioseguridad BSL-2, con la infraestructura necesaria para llevar a cabo la preparación de lotes a partir de muestras individuales y su inactivación, como etapa previa a transferir las muestras a los laboratorios de la Unidad de Genómica donde se desarrollan los análisis mediante RT-qPCR. Estos análisis podían ser parcialmente automatizados en la Unidad de Genómica gracias a la utilización de un robot de manejo de líquidos puesto a punto durante el periodo de trabajo con las residencias. La sala logística de muestras se equipó también con sistemas de almacenaje de hasta 10.000 muestras de saliva semanales, lo que incluyó el diseño de viales, cajas y estanterías adecuadas, así como de sistemas de criopreservación de muestras biológicas por congelación a -80°. Los viales, complementados con las instrucciones pertinentes, permitían recoger de forma segura e higiénica muestras de saliva personales.

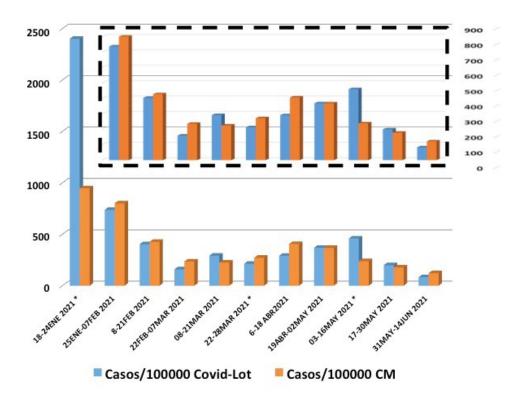
El trabajo de los Servicios Informáticos de la Universidad Complutense, coordinados desde el Vicerrectorado de Tecnología por el profesor Jorge Gómez, permitió desarrollar una aplicación específica destinada a gestionar los datos de las personas enroladas en el proyecto para su análisis periódico. La aplicación genera un código único, anonimizado, para las muestras tomadas cada semana de cada persona. Este código se utiliza para imprimir etiquetas que se

suministran junto con los viales a las personas que se analizan, y es registrado en cada una de las etapas por las que pasa el procesamiento de las muestras: en su recogida, en su llegada a la sala de logística de muestras para su conversión en lotes y en la asignación del resultado de los análisis. Ello proporciona la trazabilidad adecuada para poder monitorizar qué muestras se han recogido y en qué estado del procesamiento y análisis se encuentran en cada momento.

Tras la puesta a punto y la optimización del dispositivo COVID-LOT en la Facultad de Ciencias Biológicas, la toma de muestras y la organización de análisis periódicos se fue transfiriendo progresivamente, a partir de diciembre de 2020, a otros centros y servicios de la Universidad Complutense. En cada uno de ellos, una persona actuando como coordinador/a COVID-19 ha venido trabajando como enlace con el Proyecto COVID-LOT, encargándose de implementar los procedimientos adecuados para la distribución de materiales, la recogida periódica de muestras, su transporte hasta la sala centralizada logística en la Facultad de Ciencias Biológicas y la gestión restringida de los resultados de los análisis para definir el desarrollo de actividades presenciales, a título personal o colectivo. Ello permitió, por ejemplo, gestionar con seguridad, previniendo la aparición y extensión de brotes infectivos, el desarrollo de la vida colegial en los Colegios Mayores de la Universidad Complutense, gracias a la monitorización semanal de 600 personas entre estudiantes residentes y personal. También, el desarrollo con seguridad de las prácticas en centros educativos de primaria y secundaria de la Comunidad de Madrid de 2.000 estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Educación, que se analizaban con periodicidad quincenal durante los 3 meses de duración de sus periodos de prácticas. Son solo dos ejemplos de las múltiples actividades académicas que han podido desarrollarse con unos niveles de seguridad razonables gracias a la información suministrada por COVID-LOT.

#### Los resultados

En el periodo de tiempo en el que ha venido desarrollándose COVID-LOT, desde diciembre de 2020 hasta junio de 2023, se han analizado un total de más de 160.000 muestras de saliva de personas de diferentes colectivos de la Universidad Complutense que se han ido automuestreando de forma periódica. Ello, a razón de 500-3.000 muestras procesadas semanalmente, en función de los requerimientos de los diferentes periodos académicos y de la necesidad de cubrir actividades específicas o de atender emer-



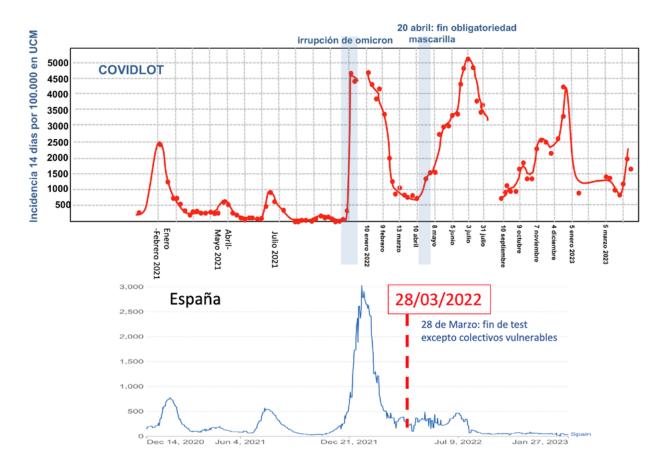
Paralelismo de datos del Programa COVID-LOT e incidencia COVID en la Comunidad de Madrid

Incidencia acumulada a 14 días/100.000 habitantes en el primer semestre de 2021, de acuerdo a los datos de COVID-LOT (barras azules) y a los datos publicados por la Comunidad de Madrid (barras naranjas).

gencias sanitarias sobrevenidas en algún colectivo particular. Se han analizado muestras de estudiantes y personal de los Colegios Mayores complutenses, de las facultades de Ciencias Biológicas, Ciencias de la Educación, Ciencias Físicas, Ciencias Geológicas, Ciencias Químicas, Farmacia, Geografía e Historia, Informática, Medicina, Odontología, y Veterinaria, del Servicio de Investigación, de los Servicios Informáticos, de la biblioteca general, o de la Fundación General de la Universidad Complutense y los Cursos de Verano de la UCM en el Escorial, entre otros.

El análisis sistemático y periódico de infectividad en el colectivo universitario ha ido proporcionando, durante los 30 meses de duración del proyecto, una visión continuada de la progresión de la pandemia, sin el sesgo de análisis que supone la determinación clínica de infectividad en personas con sospecha de infección. Una gran parte de los casi 2.000 positivos detectados en la UCM para la presencia de SARS-CoV-2 en saliva eran positivos asintomáticos sin sospecha de infección, que no hubieran tenido razón alguna para someterse a análisis de no haber formado parte del colectivo que se prospecta periódicamente en la Complutense. El proyecto ha podido así también detectar un grupo significativo de personas que han mostrado reinfección en diferentes momentos, tras periodos más o menos prolongados libres de virus. La mayoría de los casos de personas reinfectadas no presentaban síntomas y no habrían conocido su situación en ausencia de este programa. Así, los datos del programa COVID-LOT han resultado constituir una sonda eficaz e ilustrativa de la evolución de la pandemia en la Comunidad de Madrid.

Mientras la Comunidad de Madrid hacía públicos datos de infectividad, estos se mostraban paralelos a los números resultantes de los análisis semanales de COVID-LOT, que en gran medida anticipaban en unos días los disparos de las sucesivas olas de infectividad generalizada. Esto es probablemente el reflejo de que el colectivo de estudiantes y personal de la Universidad Complutense representa bien la distribución de población en las diferentes áreas de la



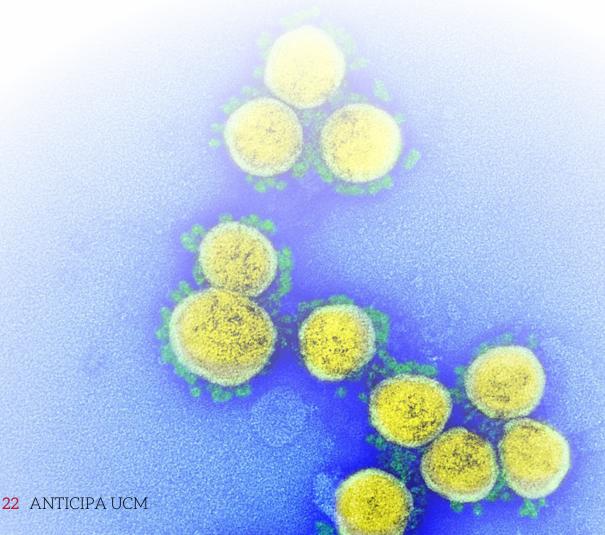
Monitorización de infectividad COVID en el colectivo complutense de acuerdo con los datos del Programa COVID-LOT en el periodo 2020-2023

Incidencia acumulada a 14 días/100.000 habitantes desde diciembre de 2020, fecha de inicio de COVID-LOT, hasta mayo de 2023. Se indican fechas relevantes, como el momento de irrupción de la variante Omicron de SARS-CoV-2, o el fin de obligatoriedad de uso de las mascarillas.

Comunidad de Madrid. El 28 de marzo de 2022 las autoridades sanitarias, a nivel nacional y de comunidades autónomas, acordaron eliminar el aislamiento de positivos asintomáticos o leves, así como las pruebas excepto en colectivos vulnerables. A partir de esa fecha y posteriormente en junio de 2022, cuando dejaron de hacerse públicos datos generales de infectividad, los índices resultantes de los análisis de COVID-LOT quedaron como un testigo único, y en principio representativo, de la evolución epidemiológica del COVID en Madrid. Así, el Gabinete de Comunicación de ANTICIPA UCM ha venido haciendo públicas diferentes notas de prensa cada vez que los datos de COVID-LOT han revelado un repunte de infectividad relevante.

COVID-LOT ha seguido funcionando hasta junio de 2023. Su infraestructura y estructura logística ha sido depurada y optimizada, por lo que está en disposición de ser reenfocada cuando sea necesario en la prospección epidemiológica de cualquier colectivo o agente patógeno que se considere de interés para la salud pública. En una última fase se pusieron a punto procedimientos para prospectar la presencia de SARS-CoV-2 en colectivos de escuelas infantiles, considerando que los centros en donde se reúnen niños de 0-3 años, sin protección vacunal y sin prác-

ticamente incidencia clínica, pueden constituirse en reservorios de virus. También se está poniendo a punto, por ejemplo, la utilización de COVID-LOT en la monitorización de infectividad por diferentes cepas de virus de gripe y, en la medida en que se considere de interés, su aplicación a la comunidad universitaria o a cualquier colectivo que pueda ofrecer datos testigo de la situación general y su evolución. Adicionalmente, se ha puesto a punto el seguimiento y la identificación de nuevas cepas del virus mediante su secuenciación, un aspecto relevante en la vigilancia epidemiológica de la infección por SARS-CoV2. COVID-LOT constituye así una prueba de concepto del valor de la medicina preventiva basada en datos reales a gran escala, con capacidad de ser ajustada a necesidades precisas de colectivos y actividades con necesidades de monitorización concretas. También constituye una prueba sólida del valor social del conocimiento multidisciplinar, de la experiencia y la capacitación técnica de frontera y de las capacidades basadas en la actividad investigadora, que reúnen y sostienen de forma única las universidades públicas. Es crucial que lo aprendido en estos tiempos de emergencia grave se consolide en una estructura que pueda dar respuesta desde la universidad a otros desafíos sociales futuros.



# COMPLUPCR: Un sistema de gestión avanzado de muestras en la red de laboratorios COVID-LOT



Antonio Velasco Horcajada

antoniv@ucm.es Interdisciplinary Mathematics Institute. Departamento de Ingeniería del Software e Inteligencia Artificial (UCM)



Fernando **Burillo López** 

fburillo@ucm.es Interdisciplinary Mathematics Institute (UCM)



Paúl Ivorra

ivorra@mat.ucm.es Interdisciplinary Mathematics Institute. Departamento de Análisis Matemático y Matemática Aplicada (UCM)



Benjamín Pierre Jorge Gómez Sanz

jjgomez@ucm.es Departamento de Ingeniería del Software e Inteligencia Artificial (UCM)



Ángel Manuel Ramos del Olmo

angel ramos@matucm.es Interdisciplinary Mathematics Institute. Departamento de Análisis Matemático y Matemática Aplicada (UCM)

urante la emergencia sanitaria provocada por la pandemia de COVID-19, ha sido necesario gestionar y coordinar la toma y análisis de cientos de miles de muestras. Antes de la llegada de las pruebas individuales, hubo un reto para el que los servicios competentes no estaban preparados, que era la gestión masiva y eficaz de muestras en un laboratorio. La tecnología permite hoy en día realizar pruebas analíticas a cientos de muestras, pero no estaba preparada para coordinar cientos de analistas que interpretan dichas muestras. Tampoco estaba listo para tratar con los casos que se dieron de saturación de los laboratorios. La respuesta aportada desde la Universidad Complutense a estos problemas fue COMPLUPCR, una solución software que permite implementar el concepto de red de laboratorios mediante lo que se conoce como un sistema de gestión de laboratorios (Laboratory Information Management System o LIMS).

### COMPLUPCR: una red de coordinación entre laboratorios

Un sistema de información de laboratorio (LIS, por sus siglas en inglés) es un software de computadora

que procesa, almacena y administra datos de todas las etapas de los procesos y pruebas médicas.

Los médicos y técnicos de laboratorio utilizan LIS para coordinar variedades de pruebas médicas para pacientes hospitalizados y ambulatorios, que incluyen hematología, química, inmunología y microbiología. Los sistemas básicos de información de laboratorio suelen tener características que gestionan el registro de pacientes, la entrada de pedidos, el procesamiento de muestras, la entrada de resultados y la demografía de los pacientes. Un LIS rastrea y almacena detalles clínicos sobre un paciente durante una visita al laboratorio y mantiene la información almacenada en su base de datos para referencia futura [1].

Una tecnología estrechamente relacionada con LIS es un sistema de gestión de información de laboratorio (LIMS), pero existen diferencias entre los dos tipos de software. Un LIS es un sistema de salud que contiene datos clínicos. En comparación, un LIMS implementa el cuidado de la salud, pero también se usa en entornos no médicos, incluidos laboratorios de pruebas ambientales, laboratorios farmacéuticos y plantas de tratamiento de agua. Un LIMS se usa como una herramienta web o instalarse en una computadora o dispositivo

personal y almacena y administra los datos capturados, además de producir informes a partir de esos datos.

El proceso de captura de datos electrónicos de un LIMS o LIS reducen el tiempo de trabajo y los errores asociados con el proceso de transcripción.

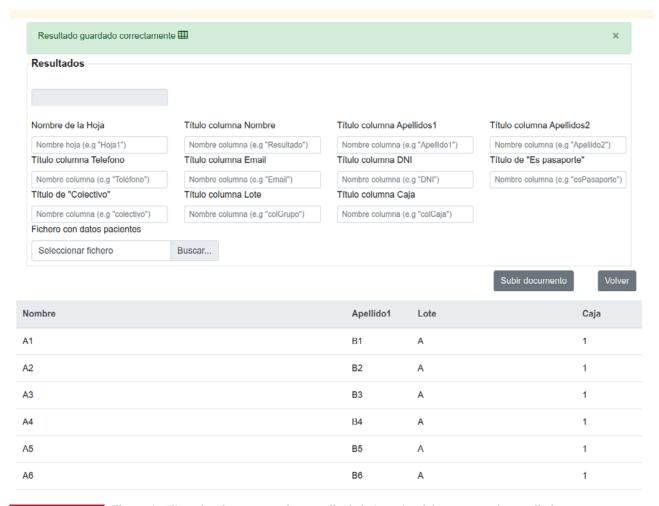
El software desarrollado para el proyecto ANTICIPA permite la coordinación en una red de laboratorios del procesamiento en cadena de las muestras entre centros, laboratorios y analistas para coordinar la producción de resultados de pruebas de PCR. Las muestras preparadas se envían a los laboratorios de PCR donde se realiza la prueba, siguiendo un protocolo de rastreo monitorizado en todo momento dentro del sistema informático. Los datos de las muestras habitualmente agrupadas en lotes sin procesar se cargan en servidores a los que acceden los analistas una vez obtenidos los resultados (determinar si es positivo o negativo) para hacer el registro y seguimiento electrónico y de esta manera cotejar estos resultados con las muestras y realizar correctamente la asociación entre ellos. Según el resultado obtenido y las características del análisis

se determinan las siguientes acciones a realizar. Por ejemplo, cuando se obtiene un resultado positivo de un lote de muestras, se reclaman las muestras individualizadas que lo componen para ejecutar el cribado que determine la muestra o muestras positivas, y si así estuviera protocolizado, enviar las alertas, avisos o informes necesarios.

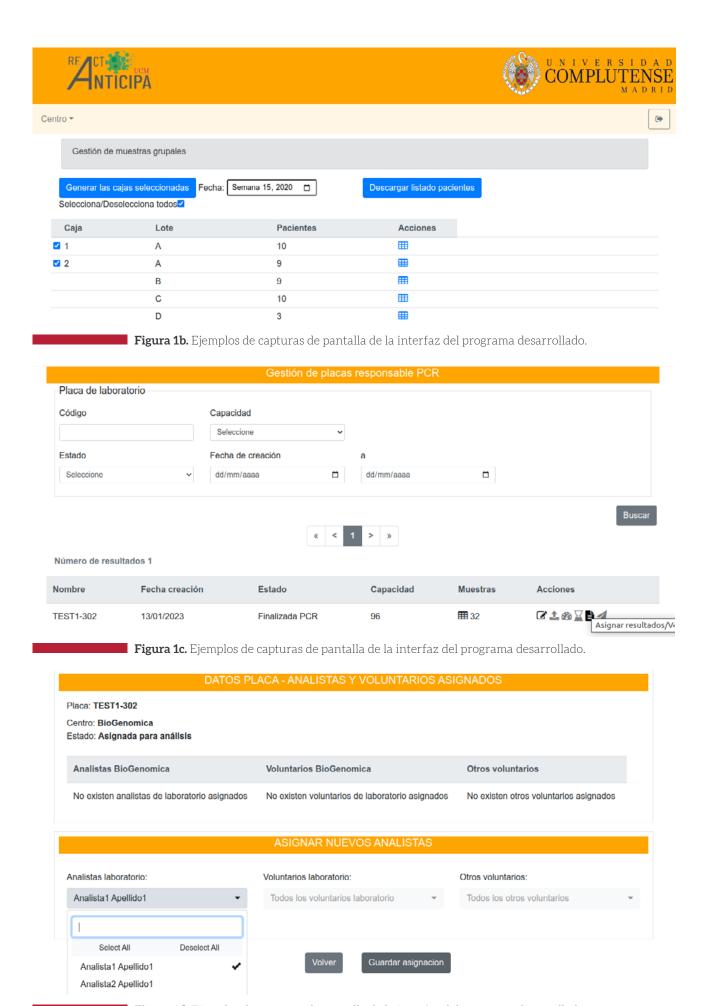
#### Cómo hacer uso del software de COMPLUPCR

El software consiste en un sistema con interfaz web. Es posible acceder mediante cualquier navegador desde la red interna de la Universidad Complutense de Madrid. Cada operario de los centros y laboratorios tendrá asignadas sus credenciales para la identificación y acceso. En la Figura 1 (a-d), se ilustran algunas capturas de pantallas de la interfaz de usuario de este programa.

Existen diferentes roles de usuario marcados en el sistema. Cada usuario se encuadra dentro de uno (o varios) de estos roles. Los roles asignados al usuario determinan los permisos de uso de las distintas fun-



**Figura 1a.** Ejemplos de capturas de pantalla de la interfaz del programa desarrollado.



**Figura 1d.** Ejemplos de capturas de pantalla de la interfaz del programa desarrollado.

cionalidades y acciones permitidas en cada etapa de trabajo dentro del protocolo de gestión de las mues-

Los usuarios dentro del rol de "centro de salud" tienen asignado en la aplicación los cometidos de registro de pacientes en los datos del sistema, quedando los pacientes registrados asociados al centro de salud al que pertenece el operador que realiza el registro.

También se encargan del alta en el sistema de muestras recogidas, bien manualmente o dentro de los lotes generados. Dentro del rol "centro de salud" existe la posibilidad de dar de alta un nuevo lote, siendo este un conjunto de muestras que deben ser enviadas todas juntas al laboratorio. Una vez creado el lote y asignadas las muestras que contiene, se designa el laboratorio al que va a ser enviado y se registra el envío físico de las muestras a través del servicio de mensajería dispuesto al efecto.

El funcionamiento de la generación de lotes consiste en una automatización utilizando la parametrización de los pacientes de los que se recogen las muestras. En la configuración del paciente se indica el lote y caja al que semanalmente se le asigna su muestra. Con esto, desde la ventana de generación de lotes y cajas se confirma la inclusión de estas muestras de pacientes en sus cajas para la semana actual. Automáticamente se generan en el sistema los identificadores de lotes y cajas, así como las etiquetas de los lotes y las cajas que se imprimen y sirven para hacer los rastreos en los envíos. Así mismo el operador del centro de salud registra la toma de las muestras y a qué laboratorio se han enviado los lotes con las muestras.

Por otra parte, el acceso con un operador identificado con el rol "recepción laboratorio" permite la confirmación de la recepción de lotes. La única tarea disponible dentro de este rol es la "recepción de lotes", que verifica que el laboratorio ha recibido físicamente los lotes de muestras asignados a él por el centro de salud. Así, dentro de la pantalla de recepción de lotes, se puede hacer una búsqueda de los lotes asignados al laboratorio por el centro de salud y que debieran haberse recibido. El laboratorio realiza la búsqueda por centro de procedencia, número de lote, estado o fecha de análisis. Así, se obtiene un listado de los lotes de muestras que cumplen con las opciones de búsqueda. El operador verifica que el lote se encuentra en las instalaciones del laboratorio, que coinciden los datos de identificación de este, así como las muestras contenidas en él y procede a confirmar su recepción en el sistema.

El acceso con un operador identificado con el rol "técnico de laboratorio", permite la realización de las de tareas específicas de dicho rol: asignar lotes a placas, gestionar placas y cargar sin datos previos del centro de salud. La asignación de lotes a placas consiste en asignar las muestras incluidas en los lotes recibidos en el laboratorio, a las placas de análisis que van a PCR.

Para ello, el operador obtiene los lotes recibidos haciendo uso de los filtros de búsqueda. Para cada lote del listado proporcionado por la búsqueda, permite comprobar las muestras incluidas. Y se asigna una referencia interna a cada uno de estos lotes que permite su identificación dentro de la placa PCR. Finalmente, se ejecuta el procesamiento de los lotes para asignar una placa PCR al lote, o lotes seleccionados. Para la asignación de los lotes a las placas es necesario crear el registro de la placa utilizada por el laboratorio, utilizando la captura de datos de la placa que ofrece el sistema indicando el laboratorio al que pertenece. Una vez asignados los lotes a la placa de laboratorio se confirma el envío a dicho laboratorio registrando el sistema la realización del envío.

El rol de operadores tipo "responsable PCR" permite confirmar las recepciones de placas PCR en el laboratorio. Además, una vez confirmada el "responsable PCR" se encarga de crear la placa para el equipo de análisis PCR. Una vez obtenidos los resultados del análisis PCR para la placa los registra en el sistema.

El rol de operador tipo "jefe de servicio" encuadra funciones de asignación de analistas en el laboratorio, que son los encargados de registrar electrónicamente en el sistema los resultados analíticos.

Los analistas disponibles anteriormente para encomendar la aplicación de resultados son usuarios del sistema con el rol "analista". Los usuarios con este rol tienen disponible la funcionalidad de asignación de los resultados a los lotes. Los resultados son asignados automáticamente por el sistema cargando un fichero de resultados que contiene campos con los identificadores y los valores del resultado. El usuario indica, según el formato del fichero, los campos a leer por el sistema y valida esta asignación. Según el protocolo se requiere que esta asignación de resultados sea redundante por lotes, por lo que el cambio de estado a resuelta y las notificaciones se envían cuando haya sido validado por los analistas.

Los operadores con acceso al sistema con el rol "estadísticas" asignado acceden a las opciones que presentan

datos estadísticos para distintos periodos de tiempo. El periodo de tiempo básico por el que se realiza algún cálculo analítico es la semana, ya que el protocolo usado para la toma de muestras es que cada participante en el estudio acude al centro una vez a la semana. Por lo que a lo largo de toda la semana se tiene recabada la información de todos los participantes en el estudio y en principio, se cuenta con que se sabe las posibles evoluciones de la población seleccionada (aunque hay muchas particularidades y casos especiales que deben tenerse en cuenta aquí). Los informes estadísticos agrupan periodos de semanas, por lo que se tienen periodos de la semana actual, la anterior y dos semanas. En la presentación visual de los resultados se puede modificar el campo de la fecha de referencia, de esta manera se recuperan datos estadísticos de los periodos con respecto a la fecha que interese. Estos datos estadísticos se presentan teniendo en cuenta tanto muestras individualizadas como por paciente, lo cual va a permitir distinguir entre "nuevos positivos" para muestras con ese resultado y a partir de ello, hacer un cálculo de la incidencia acumulada y prevalencia en los periodos elegidos.

Dentro de la opción de estadísticas también se incluye una ventana de gráficos para visualizar las evoluciones del número positivos y de la incidencia acumulada a catorce días en una serie temporal que puede ser seleccionada interactivamente por el usuario.

### Automatización del proceso

Se han automatizado una serie de procesos como la importación de ficheros tipo tablas y para el almacenaje de los campos necesarios para su utilización en el proceso de trabajo con las muestras, lotes, resultados, etc. Esta automatización en la importación de datos es una herramienta útil para ahorrar tiempo a la hora de recopilar la información que debe disponer el sistema.

La herramienta se encarga de importar los datos de un formato externo a un formato interno, con una interfaz de usuario para indicar los campos que se deben leer de los ficheros procesados para almacenarlos, por lo que es posible procesar ficheros con distintos formatos, pero se puede indicar para cada uno la manera en los que se leerá cada valor interesado. Esto permite ahorrar tiempo y recursos, ya que los datos se transferirán directamente al lugar de destino sin tener que realizar todas las acciones

manualmente. Además, el software de importación de datos evita el ingreso de datos erróneos, ya que el usuario indica con exactitud los campos a leer, así como definir qué datos deben ser descartados [2]. Esta herramienta también ofrece la posibilidad de crear una estructura de datos personalizada a la hora de realizar la operación inversa de exportación de datos a ficheros de salida. Por lo que la automatización para obtener ficheros de datos disponibles con los procesamientos de muestras, lotes, etc. es otra funcionalidad disponible.

Además de automatizaciones a la hora de tratar datos de entrada y de salida, se está trabajando en la generación y gestión de alertas con envío de notificaciones vía correo electrónico. El usuario dispondrá de un panel de control mediante el cual podrá asignar valores umbrales a distintos parámetros que desencadenará el envío de alarmas mediante los canales igualmente configurados en dicho panel de control. En el caso de los resultados de las analíticas, el sistema enviará una notificación al registrarse los resultados al usuario administrador responsable de las muestras. También los pacientes que tengan activa la notificación en sus parámetros de configuración recibirán la alerta una vez sean conocidos los resultados de su muestra.

El registro semanal de recogida de las muestras de cada paciente se realizará mediante la generación automática de las etiquetas de los lotes en los que se distribuyen las muestras. Cada paciente tendrá definida la asignación de su muestra al lote correspondiente, lo que permitirá que la creación de los lotes de la semana sea algo inmediato. A su vez dichos lotes se agruparán en cajas que serán enviadas al laboratorio. Cuando se tome la muestra física, el operador del centro anotará la designación al lote correspondiente mediante la ventana de registro de recogida de muestras.

Cuando estén listas las muestras de cada lote se validará la distribución en las cajas y el envío al laboratorio. Posteriormente, el laboratorio confirmará la llegada del envío mediante la ventana de recepción para que las muestras se pasen a la asignación de placas que irán a los equipos de análisis.

Una vez el equipo de análisis tenga disponibles los resultados de las pruebas PCR, se procederá a cargar el fichero con los identificadores de las muestras y los resultados de cada una con el formato generado por

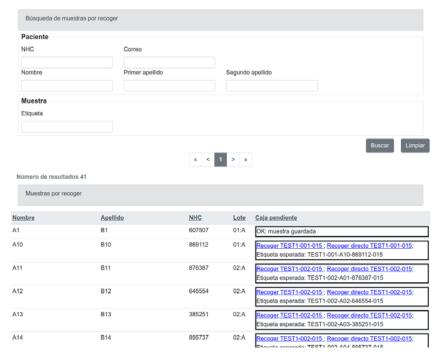
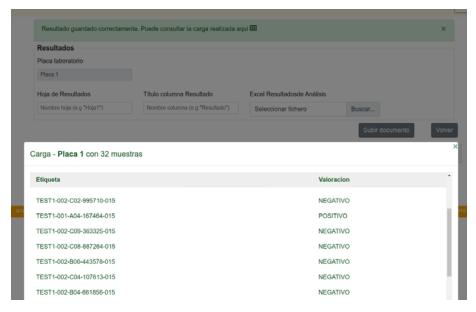


Figura 2a. Ejemplos de capturas de pantalla de la interfaz del programa desarrollado.



**Figura 2b.** Ejemplos de capturas de pantalla de la interfaz del programa desarrollado.

el laboratorio. El sistema asignará automáticamente los resultados contenidos en el fichero a las muestras correspondientes almacenadas en la base de datos.

En la Figura 2 (a-b), se muestra a través de algunas capturas de pantallas algunas consultas de datos realizadas usando este programa.

### ¿Cómo se manejan los datos recogidos?

La plataforma COMPLUPCR va a conseguir recabar una serie de datos ya bien mediante los procesos automáticos de importación de ficheros, como mediante

el propio ciclo de ejecución del protocolo de rastreo de las muestras que será almacenada en su base de datos. Uno de los principales retos de los sistemas de tratamiento de datos en entornos clínicos es asegurar la propiedad y privacidad de los datos [3]. Por ello, dentro de los requisitos a cumplir en el tratamiento de los datos obtenidos por la herramienta es hacerlo con los debidos controles para tener en cuenta dentro del marco regulatorio para este tipo de información sensible.

Uno de los objetivos del desarrollo de esta herramienta digital propia dentro del proyecto de investigación es precisamente dar valor a estos datos almacenados, utilizando herramientas de análisis estadístico y realizado sobre ellos cribados cualitativos para posibles generaciones de predicciones que hagan resaltar la utilidad de este tipo de monitorizaciones y rastreos en procesos epidemiológicos.

El software hace una clasificación de los datos según la tipología de usuario que puede hacer peticiones a su base de datos para obtener consultas. Por ejemplo, el sistema distribuye la información en entidades como pacientes (voluntarios a los que se les toman muestras), operadores y sus roles, centros, muestras, lotes, resultados, etc. Como repositorio de consulta de datos, los usuarios dispondrán de acceso a dichos datos publicados mediante restricciones de acceso según el rol asignado en el sistema. Permitiendo así proporcionar una fuente de datos analíticos salvaguardando la privacidad de datos sensibles. Así, el software podría permitir que un paciente consulte todos los datos relativos a él, mientras que este mismo paciente no podría acceder a los datos de otros pacientes, o que usuarios con la capacidad de generar tratamientos analíticos de los datos obtendrán los que necesiten de forma anonimizada sin ningún tipo de referencia que pueda identificar a pacientes o analíticas a los que pertenece.

### Informes, estadísticas y predicciones

Una de las incorporaciones a COMPLUPCR es la generación de informes estadísticos y predictivos utilizando Python y Jupyter Notebooks. Python es un lenguaje de programación muy popular y potente en el tratamiento de grandes volúmenes de datos, análisis de series temporales y creación de gráficas que muestran tendencias y patrones de comportamiento. Por otro lado, Jupyter Notebook es una herramienta muy útil que permite crear documentos interactivos para presentar los resultados de manera clara y concisa.

Estas herramientas ofrecen varios beneficios, como es que los informes y presentaciones son totalmente personalizables. Tener conexión a la base de datos y acceso al código proporciona a los investigadores con autorización la posibilidad de modificarlo y realizar su propio análisis. Además, la creación de informes no está limitada a un único lenguaje de programación, sino que también pueden ser utilizados lenguajes como R, Julia, Matlab, C#, etc.

En los informes estadísticos se muestra el cálculo de los indicadores epidemiológicos más relevantes acerca de la COVID-19 en la Universidad Complutense de Madrid, como el número de casos confirmados, el porcentaje de

positivos, la incidencia acumulada y prevalencia para un periodo de tiempo dado, etc. En cambio, en los informes predictivos se estudian las series temporales y se entrenan diferentes modelos de machine learning para obtener predicciones sobre el número de positivos en un futuro cercano, lo que es útil para tomar decisiones y planear protocolos en función de los resultados.

En la Figura 3 (a-b), se muestran algunas posibilidades de estadísticas, gráficas y predicciones generadas por este programa.

### Una herramienta con potencial en el campo de la salud

Utilizar una aplicación web como COMPLUPCR para la identificación y trazabilidad de muestras sanitarias tiene un potencial enorme por su capacidad para mejorar la eficiencia, precisión, seguridad y colaboración en el proceso de gestión de muestras de cualquier organización, hospital o farmacéutica.

- 1. Eficiencia. Permite introducir y consultar rápidamente la información sobre las muestras, lo que reduce errores y mejora la velocidad de procesamiento. Además, la integración con sistemas y bases de datos externas facilita la recopilación y el análisis de datos y mejora la trazabilidad, permitiendo a la organización gestionar más eficientemente las muestras y reducir los tiempos de espera para los pacientes y los clientes.
- 2. Precisión. Proporciona una interfaz fácil de usar y accesible que ayuda en la verificación y validación de la información de manera sencilla y rápida. Esto mejora la confianza en la información y reduce el riesgo de errores graves.
- 3. Seguridad. Acceder con diferentes roles y funcionalidades y obtener un seguimiento en tiempo real de la ubicación y el estado de las muestras es especialmente importante y útil en entornos clínicos y de investigación. Esto ayuda a garantizar la seguridad y la calidad de las muestras y evitar pérdidas.
- 4. Colaboración. Es una de las razones por las que se creó esta aplicación y por lo que es tan útil. Permitir la colaboración entre distintos departamentos, laboratorios y organizaciones facilita la comunicación para compartir información sobre las muestras y coordinar su gestión de manera más sencilla y eficiente.

### Resultados identificados en la UCM las dos últimas semanas (desde 26-abr.-2021 hasta 09-may.-2021)

	Muestras	Muestras		Pacientes			
Centro	POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVOS	NEGATIVOS	INCIDENCIA ACUMULADA	PREVALENCIA	
Centro de Salud TEST-1	7	834	7	438	1215	2083	
Facultad de Biologia	7	836	7	439	1220	1568	
Instituto de Salud Carlos III	16	825	15	422	2613	4878	
Centro de salud TEST-2	8	833	8	435	1391	2609	
Centro de salud TEST-3	9	834	9	433	1582	3163	
Centro de salud TEST-4	9	835	9	433	1571	2967	
Total	56	4997	55	2600			

### Resultados identificados en la UCM la semana anterior (desde 03-may.-2021 hasta 09-may.-2021)

	Muestras	Muestras				
Centro	POSITIVAS	NEGATIVAS	POSITIVOS	NEGATIVOS	INCIDENCIA ACUMULADA	PREVALENCIA
Centro de Salud TEST-1	4	389	4	386	694	2083

Figura 3a. Ejemplos ilustrativos de estadísticas, gráficas y predicciones generadas con el programa desarrollado.

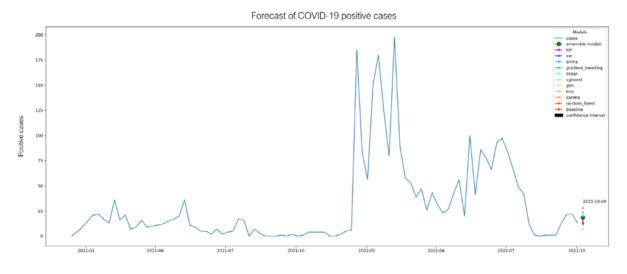


Figura 3b. Ejemplos ilustrativos de estadísticas, gráficas y predicciones generadas con el programa desarrollado.

5. Ayudar en la toma de decisiones. Contar con estadísticas, alertas y predicciones es de gran ayuda a la hora de tomar decisiones por las personas competentes para ello.

En los últimos años se ha demostrado la eficacia de los modelos de aprendizaje automático e inteligencia artificial debido a su poder de procesamiento y habilidad de detección de patrones difíciles de identificar a sim-

ple vista. Durante la crisis sanitaria del COVID-19, este tipo de tecnología se ha utilizado, junto con los modelos de tipo SIR clásicos [4,5,6,7] para el rastreo de contactos a través de aplicaciones móviles basadas en Bluetooth o GPS, detección de casos positivos de COVID-19 con un modelo de deep learning e imágenes de rayos X de tórax [8], en el estudio y desarrollo de medicamentos y vacunas para virus como el Ébola, VIH y SARS-Cov-2 [4,5,6,7,9,10].

Implementar estos modelos de machine learning en la aplicación COMPLUPCR para predecir el número de infectados añade mucho valor a la herramienta porque puede ser muy beneficioso para mejorar la predicción temprana, identificar factores de riesgo, ayudar a los responsables a tomar decisiones rápidas y precisas y a ser más eficiente en la gestión y control de pandemias ajustando las medidas de control en función de la situación actual.

En resumen, esta tecnología destaca especialmente por su papel en el intento de prever el avance de cualquier enfermedad transmisible, ayudando a la hora de aplicar las medidas correctas con anticipación para contenerla hasta su desaparición.

\*Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado gracias al proyecto REACT-ANTICIPA de la UCM (financiado por la Comunidad de Madrid), al proyecto PID2019-106337GB-I00 (financiado por el Gobierno de España) y al Grupo de Investigación MOMAT (Ref. 910480) financiado por la Universidad Complutense de Madrid y el Instituto de Matemática Interdisciplinar (IMI). El primer y el segundo autor han realizado su trabajo contratados por el citado proyecto RE-ACT-ANTICIPA.

### Bibliografía

- 1. Harrison, Jeffrey P.; McDowell, Geoffrey M. (2008). The role of laboratory information systems in healthcare quality improvement. International Journal of Health Care Quality Assurance, 21(7), 679-691. DOI: https://doi. org/10.1108/09526860810910159
- 2. Michael Tortorella. Reliability, Maintainability, and Supportability: Best Practices for Systems Engineers. John Wiley & Sons, Mar. 2015. isbn: 9781118858882. DOI: https://doi. org/10.1002/9781119058823
- 3. Evans RS. Electronic Health Records: Then, Now, and in the Future. Yearb Med Inform. 2016 May 20; Suppl 1(Suppl 1):S48-61. doi: 10.15265/IYS-2016-s006.PMID:27199197;PMCID:PMC5171496. DOI: https://doi.org/10.15265/IYS-2016-s006
- 4. A.M. Ramos, M. Vela-Pérez, M.R. Ferrández, A.B. Kubik and B. Ivorra, Modeling the impact of

- SARS-CoV-2 variants and vaccines on the spread of COVID-19. Communications in Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation, Vol. 102, 2021, 105937. DOI link: https:// doi.org/10.1016/j.cnsns.2021.105937. Preprint, first version 17 January 2021. DOI link: http:// www.doi.org/10.13140/RG.2.2.32580.24967/2
- 5. B. Ivorra, A.B. Kubik and A.M. Ramos. La utilidad de las Matemáticas en tiempos de pandemia. New Medical Economics - ANTICIPA UCM n°1, Julio 2023.
- 6. A. M. Ramos, M. R. Ferrández, M. Vela-Pérez, A.B. Kubik & B. Ivorra. A simple but complex enough  $\theta$ -SIR type model to be used with COVID-19 real data. Application to the case of Italy. Physica D: Nonlinear Phenomena, 421: 132839 (2021). DOI: https://doi.org/10.1016/j.physd.2020.132839.
- 7. A.M. Ramos, M. Vela-Pérez, M.R. Ferrández, A.B. Kubik & B. Ivorra. Modeling the impact of SARS-CoV-2 variants and vaccines on the spread of COVID-19. Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation, 102: 105937 (2021). DOI: https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2021.105937
- 8. Tulin Ozturk, Muhammed Talo, Eylul Azra Yildirim, Ulas Baran Baloglu, Ozal Yildirim, and U Rajendra Acharya. Automated detection of covid-19 cases using deep neural networks with x-ray images. Computers in biology and medicine, 121:103792, 2020. DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j">https://doi.org/10.1016/j</a>. compbiomed.2020.103792
- 9. Yi-Yu Ke, Tzu-Ting Peng, Teng-Kuang Yeh, Wen-Zheng Huang, Shao-En Chang, Szu-Huei Wu, Hui-Chen Hung, Tsu-An Hsu, Shiow-Ju Lee, Jeng-Shin Song, et al. Artificial intelligence approach fighting covid-19 with repurposing drugs. Biomedical journal, 43(4):355-362, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.05.001
- 10. B. Ivorra, D. Ngom & A. M. Ramos, Be-CoDiS: A Mathematical Model to Predict the Risk of Human Diseases Spread Between Countries-Validation and Application to the 2014--2015 Ebola Virus Disease Epidemic. Bulletin of Mathematical Biology, 77(9): 1668-1704 (2015). DOI: http:// dx.doi.org/10.1007/s11538-015-0100-x

# Inmunidad y protección antiviral frente al SARS-CoV-2



José Ramón Regueiro González-Barros

regueiro@ucm.es Catedrático del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina (UCM)



**Narcisa** Martínez Quiles

namartin@ucm.es Profesora titular del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina (UCM)



Nineth E Rossi

nirossi@ucm.es

Doctora contratada del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina (UCM)



Agustín Tortajada Alonso

agustito@ucm.es Profesor ayudante doctor del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina (UCM)



Rebeca Fernández Megino

rebecfer@ucm.es Estudiante de doctorado del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina (UCM)

os virus como el de la gripe, la viruela o el VIH son una de las mayores amenazas para la salud y la seguridad global, pero ha sido el coronavirus SARS-CoV-2 el que ha recordado el impacto devastador en la salud de las personas y la economía mundial que una pandemia, como la de COVID-19, puede tener.

SARS-CoV-2, infecta la mucosa nasal y oral, principalmente por vía respiratoria desde otra persona infectada, sobre todo al hablar o toser. Una vez en la mucosa, es capaz de entrar en las células que expresan en su superficie la enzima ACE2 (enzima convertidora de la angiotensina 2), que actúa como receptor al encajar con la proteína spike de la cubierta del virus. Entre dichas células están las del epitelio olfatorio, de ahí que pueda verse afectado el olfato. Pero por suerte, no se está completamente indefenso contra los virus, se cuenta con la ayuda de un fiel aliado, el sistema inmunitario.

El sistema inmunitario ha desarrollado recursos tanto innatos como adaptativos contra los virus, para detectarlos, combatirlos y prevenirlos. La inmunidad innata es la primera línea de defensa y trabaja rápidamente para combatir cualquier invasor que encuentre. Por otro lado, la inmunidad adaptativa tarda un poco más en desarrollarse, porque implica la producción de anticuerpos y el reclutamiento de células inmunitarias especializadas, como los linfocitos T y B, pero es más

específica. Conocer en profundidad esta respuesta inmunitaria contra el SARS-CoV-2 es clave para poder desarrollar estrategias de prevención, vacunas y tratamientos de la COVID-19.

En este grupo de la Universidad Complutense de Madrid se trabaja en evaluar la respuesta inmunitaria contra el SARS-CoV-2, para identificar patrones asociados a sus características demográficas y clínicas.

Se quiere determinar la inmunidad innata midiendo los niveles y actividad global del sistema del complemento, así como la inmunidad adaptativa analizando las respuestas de linfocitos T y B en individuos infectados o vacunados como subtipos de linfocitos o anticuerpos virus-específicos utilizando técnicas novedosas que se detallan en este artículo.

### La inmunidad innata puede ser un arma de doble

Como se ha mencionado antes, la primera parte de la respuesta inmunitaria es lo que se conoce como respuesta inmunitaria innata. En ella participan células y moléculas tanto extra como intracelulares que son capaces de actuar inmediatamente, en minutos tras el contacto con el virus.

Entre las moléculas extracelulares destaca el sistema del complemento, un sofisticado conjunto de proteí-

nas capaces de reconocer a los virus y eliminarlos, o bien marcarlos (opsonización) para ser eliminados por otras células del sistema inmunitario como los macrófagos, que los fagocitan y destruyen. Además, sus componentes atraen (anafilotoxinas) y activan a otras células inmunitarias. El correcto funcionamiento del complemento es esencial para resolver diversas infecciones. Sin embargo, su activación excesiva puede ser también perjudicial, provocando daños sobre tejidos propios y perpetuando la inflamación y la respuesta inmunitaria inapropiada. De hecho, estudios recientes indican que la activación del complemento contribuye al fenómeno hiperinflamatorio observado en los pacientes con COVID-19, incluido el persistente. Estudiar el papel del complemento en dicha patología está abriendo vías interesantes en el desarrollo de nuevas terapias.

Entre los mecanismos intracelulares destaca la producción de interferones de tipo I (IFN-I) en respuesta al RNA viral intracelular. Los interferones son moléculas de la familia de las citocinas que a su vez actúan sobre las células con su receptor de dos maneras: previniendo que el virus se multiplique en la célula infectada parando la maquinaria celular de producción de proteínas y activando a otras células inmunológicas para que se protejan del virus. De hecho, la mortalidad del COVID-19 aumenta en personas con deficiencias de este tipo de inmunidad. En las células infectadas, además, las proteínas del virus son reconocidas por componentes de las rutas del inflamasoma, un complejo molecular responsable de la producción de citocinas inflamatorias como la interleucina IL-1β, y en las mucosas (como en el pulmón) la IL-18. Una producción excesiva tanto de IFN-I como de interleucinas (IL-1β, IL-18) también contribuye al desarrollo del síndrome hiperinflamatorio de pacientes con COVID-19 grave [1].

### La inmunidad adaptativa es específica y duradera

Las células dendríticas son las que captan virus o partes de este, se dirigen a los centros de encuentro más cercano (ganglios y otros órganos linfoides secundarios) y se los enseñan (presentan) en trocitos (péptidos) sobre las moléculas de histocompatibilidad a los linfocitos T. Otras células (entre ellas las dendríticas foliculares en los ganglios) fijan el virus nativo y lo presentan a los linfocitos B. Estas dos actuaciones en el entorno adecuado de señales (citocinas y otras moléculas) ponen en marcha la respuesta inmunitaria adaptativa, que suele tardar de 7 a 10 días en comenzar, y que es más específica (Figura 1).

Como consecuencia, los linfocitos B se diferenciarán en células productoras de anticuerpos virus-específicos (células plasmáticas) que producirán primero inmunoglobulina M (IgM) y más tardíamente inmunoglobulina G (IgG), a lo que se llama cambio de isotipo. Una pequeña población de esas células permanecerá como linfocitos B de memoria específicos frente al virus, que esperarán durante décadas a encontrarse de nuevo con éste y relanzar una respuesta inmunitaria mucho más rápida. Además, a lo largo de la infección y en infecciones sucesivas si las hubiera, existe un proceso capaz de ir mejorando la calidad de las IgGs, de manera que cada vez se ajustan mejor a los componentes del virus (maduración de la afinidad). Existen 4 subclases de IgGs (IgG1 a IgG4) con distintas especializaciones funcionales. En general, se considera que la IgG1 es muy protectora, pero a su vez más inflamatoria, mientras que, en el otro extremo, la IgG4 es menos protectora pero también menos inflamatoria. Es posible que los individuos respondan de manera distinta a la infección por el virus o la vacunación en términos de producción de inmunoglobulinas (cantidad y subclase) y, por lo tanto, también es posible que las subpoblaciones de linfocitos B de memoria frente al virus varíen en cuanto a la representación de los isotipos (IgM, IgG1-IgG4 o IgA), por lo que es muy interesante estudiar ambos parámetros en grupos concretos de la población.

Ahora se sabe que el SARS-CoV-2 tiene cierto parecido a los coronavirus que causan resfriado común que ya circulaban antes de la pandemia. Esto implica que muchas personas previamente infectadas por los coronavirus "comunes" producirían otro componente que actúa de manera inmediata en las mucosas oral y nasal y que es la inmunoglobulina A (IgA). Esta podría bloquear en cierta medida la infección de las células por el coronavirus SARS-CoV-2 y neutralizarlo. Por ello, se piensa que la estrategia de vacunación intranasal -de desarrollarse- podría resultar más efectiva, pues se atacaría al virus en el momento de su entrada inicial al organismo.

Además, para combatir el SARS-CoV-2 y otros virus también es necesaria la implicación de los linfocitos T. Los linfocitos T una vez maduros expresan un receptor de superficie TCR-CD3, salen del timo y circulan por los vasos sanguíneos y linfáticos hasta que reconocen los péptidos de un patógeno presentados por otras células en las moléculas de histocompatibilidad (MHC). Existen dos subtipos principales de linfocitos T en función de la presencia de otra molécula de superficie: CD4, que reconoce a las moléculas de histocompatibilidad MHC II, y CD8, que reconoce a las moléculas de histocompatibilidad MHC I.

Los linfocitos T CD8 o citotóxicos reconocen antígenos presentados en la superficie de células infectadas o anormales. Una vez que se unen, los linfocitos T CD8 liberan moléculas citotóxicas, como la perforina y la granzima, que actúan para matar las células objetivo. La perforina crea poros en la membrana celular de la célula infectada, lo que permite que las granzimas ingresen y actúen en su interior, causando daño celular y finalmente la muerte de la célula. De esta forma evitan la propagación del virus por el organismo.

Los linfocitos T CD4 o colaboradores pueden ser diferenciados en distintos tipos que realizan diferentes funciones y producen diferentes citocinas. Estos son fundamentalmente: Th1, Th2, Th17, Tfh y Treg. Otro subtipo T fundamental son los linfocitos T de memoria. Su imprescindible función es la de generar memoria frente a un patógeno con el fin de que el sistema inmunitario sea capaz de defenderse con mayor rapidez y eficacia. De momento se desconoce la importancia de la respuesta de los distintos subtipos de linfocitos

T durante la infección por SARS-CoV-2 y tras la vacunación, por tanto, es importante estudiarlo en detalle.

### ¿Cómo se puede conocer la inmunidad antiviral?

Los ensayos más utilizados son los que miden los anticuerpos virus-específicos fundamentalmente por ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima), pero más recientemente se han universalizado los estudios de linfocitos virus-específicos por citometría tras estimulación con péptidos virales. Ambos pueden ayudar a conocer la inmunidad post-infección o post-vacunación. A continuación, se resumen las técnicas utilizadas en este estudio de SARS-CoV-2.

Primero, se ha seleccionado una población compuesta por 42 individuos voluntarios expuestos al virus SARS-CoV-2 y vacunados, y, por otro lado, 77 individuos no expuestos y no vacunados. Todos los individuos eran de ambos sexos y mayores de edad (rango de 21 a 65 años), y se encontraban sanos en el momento de la toma de la muestra (Figura 2).

Una vez obtenidas las muestras de dichas poblaciones se han analizado distintos aspectos de la inmunidad

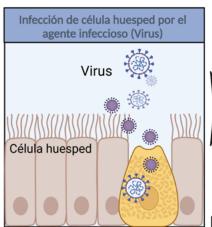
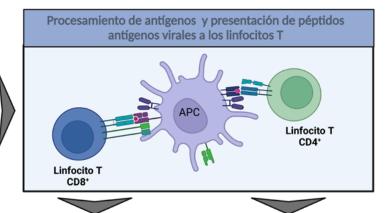
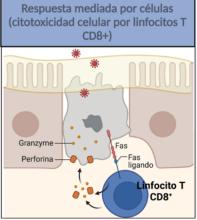
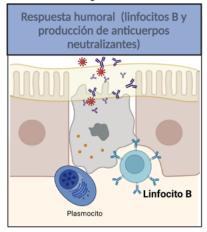


Figura 1. Inmunidad adaptativa antiviral. Los linfocitos T virus específicos se diferencian hacia T CD8+ que atacan células infectadas por virus, y los linfocitos T CD4+ ayudan a otros linfocitos a diferenciarse. Los linfocitos B virus específicos sintetizan anticuerpos que previenen nuevas infecciones. Imagen creada en www.biorender.com







**Figura 1.** Inmunidad adaptativa antiviral. Los linfocitos T virus-específicos se diferencian hacia CD8+, que atacan células infectadas por virus, y CD4+, que ayudan a otros linfocitos a diferenciarse. Los linfocitos B virus-específicos sintetizan anticuerpos que previenen nuevas infecciones.

innata y adaptativa. En concreto, se ha medido la actividad y niveles del complemento, los niveles de inmunoglobulinas anti-spike y los niveles de linfocitos By Tanti-spike.

Para saber si el sistema del complemento está funcionando correctamente, se realiza una prueba llamada CH50. En esta prueba, se mezclan muestras de suero de la persona con eritrocitos de carnero y se observa si estas células son destruidas por el sistema del complemento. Esto ocurre porque las células de carnero carecen de las proteínas reguladoras que en humanos impiden la activación del complemento frente a las propias células.

Si hay hemólisis (rotura de eritrocitos), se libera hemoglobina, y la cantidad medida de esta sirve para determinar si el sistema del complemento está activado adecuadamente. Por otra parte, también se determina si la persona tiene niveles adecuados de las proteínas del complemento. Para ello, se realiza un ELISA, empleando anticuerpos específicos de estas proteínas.

### Un nuevo método para determinar inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2

Para evaluar la inmunidad antiviral humoral, se mide la cantidad de anticuerpos producidos contra componentes del virus, como la proteína spike. En España, la mayoría de las personas han sido vacunadas y han sufrido la infección, por lo que tienen una inmunidad híbrida y han desarrollado anticuerpos contra la proteína spike (debido tanto a la vacunación como a la infección) y otras proteínas del virus como la proteína de la nucleocápside (solamente si hubiese sido infectado).

En este caso, se mide la cantidad de anticuerpos anti-spike utilizando unas células llamadas Jurkat (linfocitos T) que expresan en su superficie la proteína spike. Como referencia, las células expresan otra proteína, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [2]. Estas células se incuban con los sueros a analizar y, posteriormente, con un segundo reactivo que son anticuerpos que reconocen la región constante (Fc) de los distintos subtipos deinmunoglobulinas humanas. El método ha sido adaptado para poder determinar IgM, IgG totales, IgA e incluso IgG1-IgG4.

Los anticuerpos secundarios están conjugados (marcados) con un fluorocromo adecuado para su lectura en un citómetro de flujo, que se efectuó en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de microscopía y citometría de la UCM. Además, como control se usa un anticuerpo secundario anti-EGFR conjugado a un segundo cromóforo. Finalmente, los resultados se expresan como un cociente de la intensidad media de fluorescencia (MFI) con respecto al EGFR (Figura 3).

### Los linfocitos B de memoria aumentarían tras la vacunación

Otro abordaje para la valoración de generación de respuesta frente al virus ya sea tras infección o vacunación, es el análisis de la cantidad de linfocitos B de memoria frente a la proteína spike del SARS-CoV-2. Para ello, se utiliza un fragmento de la proteína spike recombinante (fragmento RBD) marcado con una sustancia fluorescente que es capaz de unirse a la inmunoglobulina que se expone en la superficie de los linfocitos B únicamente cuando esta inmunoglobulina sea específica de dicho fragmento. De este modo, se pueden identificar las células B que circulan en la sangre y que son capaces de reconocer la proteína del virus. Estas células B de memoria pueden sobrevivir durante décadas en el organismo a la espera de encontrarse con el virus, por lo que su presencia es un signo de inmunidad frente a este y mediante cito-

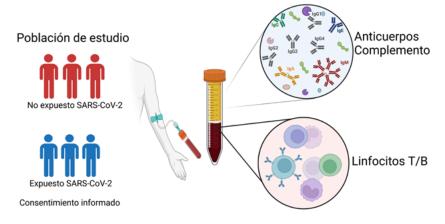


Figura 2. Poblaciones y estudios de la respuesta inmunológica frente al coronavirus SARS-CoV-2.

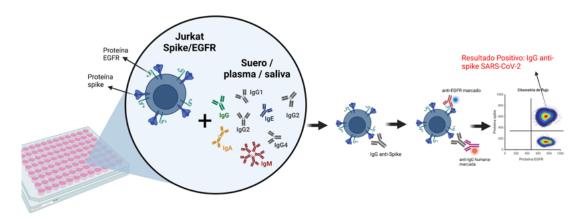


Figura 3. Determinación de inmunoglobulinas anti-spike mediante expresión en células Jurkat y citometría de flujo.

metría de flujo se puede cuantificar su presencia en sangre. Para ello, se aíslan células mononucleares de sangre de los individuos a estudiar y se criopreservan en un biobanco hasta el momento del estudio. Una vez se obtuvieron las muestras de sangre de todos los pacientes antes, durante y después de la vacunación, se procedió con la puesta a punto de la técnica. Esta se basa en la identificación de células B (CD19+) de memoria (CD27+) humanas de sangre periférica mediante citometría de flujo, y capaces de reconocer a través de la inmunoglobulina de superficie el fragmento de la proteína spike. Mediante esta técnica se puede identificar el porcentaje de células B de memoria para RBD que presentan una inmunoglobulina IgM, IgG o IgA, lo cual variará a lo largo del tiempo y de la vacunación o exposición al virus. Los resultados preliminares indican que el porcentaje de células B de memoria del isotipo IgG específicas del virus aumenta tras la vacunación.

### Subtipos de linfocitos T y sus citocinas informan sobre la respuesta al virus

Para obtener más información sobre la inmunidad adaptativa tras la infección o la vacunación frente a SARS-CoV-2 es conveniente estudiar la respuesta inmunitaria de los diferentes subtipos de linfocitos T y la de las diferentes citocinas que intervienen. Para ello, se utilizan las células de la sangre aislada recogida a distintos tiempos de la infección/vacunación de distintos individuos y se hace un ensayo in vitro. Este ensayo consiste en la exposición (estimulación) de estas células a distintas proteínas (péptidos) de diversas variantes del virus [2]. A través de este ensayo se determina cómo los diferentes linfocitos T responden

ante el virus, de tal forma que se puede conocer la eficacia de la respuesta inmunitaria. Una vez realizado el ensayo se estudia cada población de linfocitos T y algunas de sus citocinas (Tabla 1).

Para identificar las distintas poblaciones de linfocitos T y las citocinas implicadas en la infección/vacunación de los individuos se realiza un ensayo in vitro. Este ensayo consiste en la exposición de las células de la sangre a distintos péptidos del SARS-CoV-2 [3]. Una vez estimuladas las distintas muestras recogidas, se estudian las distintas subpoblaciones de linfocitos T y las citocinas que producen mediante el uso de un equipo llamado citómetro espectral. El aparato es capaz de reconocer múltiples marcadores de los subtipos de linfocitos T (como puede ser CD4, CD8, CD45RA...) además de sus citocinas. Para ello, el diseño de un panel de espectral previo al análisis es fundamental. Esta información dará pistas acerca de cómo se comportan los linfocitos T de un mismo individuo tras haber sido expuestos al virus previa y posteriormente a la vacunación, o tras la infección.

### Hallazgos prometedores en personas vacunadas y expuestas al virus

En la Figura 4 se muestran los resultados de la determinación de todas las clases de inmunoglobulinas (anticuerpos), cuyos resultados se normalizaron como un cociente con respecto al control EGFR para 22 sueros pre-pandemia (grupo de individuos no expuestos al SARS-CoV-2, en rojo) y para 26 individuos sanos y expuestos al virus (grupo de individuos expuestos al SARS-CoV-2, en azul). Como se puede observar, hay un aumento en la producción de inmunoglobulinas

Linfocitos T CD4+	Funciones	Citocinas producidas
Th1	Activa macrófagos y linfocitos T CD8+	IFN-γ, TNF-α, IL-2
Th2	Activa eosinófilos y mastocitos	IL-4, -5 -6, -9, -10, -13
Th17	Inflamación y activa neutrófilos	IL-17, IL-21, IL-22
Tfh	Activa linfocitos B	IL-4, IL-21
Treg	Suprime respuestas, autotolerancia	IL-10, IL-35, TGF-β

**Tabla 1.** Subtipos de linfocitos T CD4+. Funciones y citocinas producidas.

en individuos que han sido expuestos o vacunados contra el SARS-CoV-2, en comparación con aquellos que no han estado expuestos.

En resumen, este grupo ha desarrollado un sistema de detección altamente sensible y fácil de utilizar para identificar todas las subclases de inmunoglobulinas anti-spike. Esto permite estudiar cómo responde la inmunidad a la infección por SARS-CoV-2 y ayudar en el desarrollo de tratamientos y vacunas más efectivas.

## Camino por recorrer

En el futuro cercano, se ampliarán estos resultados completando los análisis del sistema de complemento, así como el estudio de los subtipos de linfocitos T y B. Además, se planea estudiar un grupo de pacientes que han experimentado COVID persistente, una condición poco estudiada que puede abrir nuevas vías de investigación en inmunología y proporcionar información valiosa para entender cómo el cuerpo combate contra SARS-CoV-2.

\* Agradecemos a Ana V. Marin, Marta Herrero e Iván Estévez por su contribución a parte de la información suministrada en el artículo

## Bibliografía

- 1. Weatherhead JE, Clark E, Vogel TP, Atmar RL, Kulkarni PA. Inflammatory syndromes associated with SARS-CoV-2 infection: dysregulation of the immune response across the age spectrum. J Clin Invest. 2020 Dec 1;130(12):6194-6197.
- 2. Horndler L, Delgado P, Abia D, Balabanov I, Martínez-Fleta P, Cornish G, Llamas MA, Serrano-Villar S, Sánchez-Madrid F, Fresno M, van Santen HM, Alarcón B. Flow cytometry multiplexed method for the detection of neutralizing human antibodies to the native SARS-CoV-2 spike protein. EMBO Mol Med. 2021 Mar 5;13(3):e13549.
- 3. PepTivator® SARS-CoV-2 Prot S | Proteína Spike | Peptide Pool | Miltenyi | España (miltenyibiotec.com).

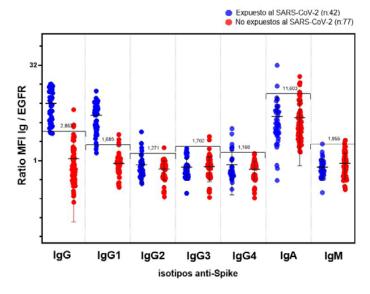


Figura 4. Cuantificación de los distintos isotipos de inmunoglobulinas (anticuerpos) frente a la proteína spike mediante citometría de flujo, en donantes voluntarios expuestos (azul) y no expuestos (rojo) al SARS-CoV-2. Se muestra la media con dos desviaciones estándar.

## Producción recombinante de inmunógenos virales



Sara García Linares

sglinares@ucm.es

Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (UCM)



## Álvaro Martínez del Pozo

alvaromp@ucm.es

Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (UCM)

## Complejidad del genoma: más allá del número de genes

l genoma humano contiene 3.200 millones de pares de bases, una cantidad ingente de información codificada. Sin embargo, solo un dos por ciento de esta información se descodifica en forma de proteínas, lo que equivale a unos veinte mil genes. Es decir, aparentemente, con solo 20.000 archivos de este disco duro que constituye el genoma se puede construir un ser humano, el ápex de la evolución (al menos desde este punto de vista). Paradójicamente, un pulpo tiene 33.000 genes codificantes de proteínas, aproximadamente un treinta por ciento más que un ser humano. Aunque es verdad que los cefalópodos son extremadamente inteligentes, este dato sorprende porque no dejan de ser moluscos. Este escenario es aún más extraño si se considera que la planta del arroz (Oryza sativa), que ni siquiera se mueve, contiene unos cincuenta mil genes en su genoma en su disco duro.

Por paradójico que pueda parecer el párrafo anterior, y siguiendo con las analogías informáticas, se puede afirmar que lo importante no es el número de genes (de bits, de archivos...) sino cómo está codificada la información y cómo se relacionan entre sí. Es decir, es más importante el papel del programador y el software empleado, que el propio hardware. Hay que asumir que el programador ha sido (es) la evolución y está claro que el software lo constituyen las proteínas. Aunque se trate de una afirmación un tanto

simplista, se puede decir que ellas son las que ejecutan los programas y construyen y mantienen a un ser vivo. Igual que un teléfono inteligente de hoy en día no tiene nada que ver en capacidades y tamaño con un teléfono fijo de hace unos años, los organismos más complejos, como los humanos, han evolucionado hacia sistemas que usan softwares mucho más complejos y económicos (informáticamente hablando). No cuenta solo cuántas proteínas se producen, sino también cuándo, cómo y para qué tiene lugar esta producción. La complejidad nace de las relaciones entre las moléculas y de cómo se gobiernan estas relaciones, de lo que se llama la regulación de la expresión génica y, en definitiva, del metabolismo.

Los virus en general, y el SARS-CoV-2 en particular, son microorganismos muy simples. Tanto que incluso se discute si están vivos. Con un pequeño número de genes, solo unas decenas, en muchas ocasiones, son capaces de producir proteínas clave para reconocer, invadir y parasitar las células que constituyen su diana. Tienen un software muy limitado, pero, al igual que los virus informáticos (que le han copiado el nombre a los biológicos), se aprovechan de los programas (de las proteínas) de las células que constituyen su diana para reconocerlas, infectarlas y proliferar a su costa. Al igual que se equipan los ordenadores con un programa antivirus, los organismos infectados no están tampoco indefensos. Especialmente los vertebrados, porque tienen un sistema inmune adaptativo, que no solo reconoce a los patógenos, sino que los recuerda, aprende de su experien-

cia previa y es capaz de construir una estrategia de defensa basada esencialmente en el reconocimiento de las proteínas virales (en el caso que ocupa en este artículo) y en la tolerancia de las propias.

## Producción de proteínas en la lucha contra patógenos

Esta carrera evolutiva entre patógeno y hospedador es la base de la mayoría de las pruebas de diagnóstico rápido y de todas las vacunas. Por tanto, producir proteínas virales, en gran cantidad y calidad, es un paso esencial para la mejora del diagnóstico, la prevención e, incluso, la terapia. La estrategia general es muy sencilla. Primero se identifica alguna proteína exclusiva del virus (Figura 1), que sea esencial para su funcionalidad, y luego se utiliza para estimular la producción (en el caso de las vacunas) o la detección (si se trata de diagnóstico) de los anticuerpos o

células del sistema inmune capaces de reconocerla y anularla. Así, en la lucha contra los patógenos virales es de suma importancia disponer de sistemas que permitan obtener cantidades importantes de las proteínas clave elegidas, con características idénticas a las que poseen cuando forman parte del patógeno. Proteínas que, por otra parte, y tal vez excluyendo el caso de algunas reacciones alérgicas, serán totalmente inocuas para el organismo hospedador. Es muy importante recalcar que no basta con que la proteína elegida tenga la misma secuencia de aminoácidos que la del virus, sino que es necesario que se produzca en un ambiente que propicie tanto su correcto plegamiento como la introducción de las modificaciones químicas necesarias para que sea correctamente identificada como idéntica a la proteína viral.

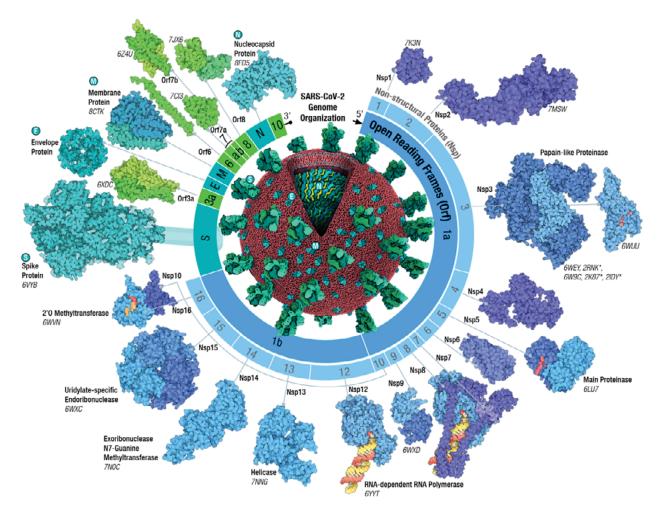


Figura 1. Se muestra un esquema del coronavirus SARS-CoV-2 en el que se representan todas sus proteínas, así como su envuelta lipídica (en rojo) y el complejo que forman su genoma ARN y la nucleoproteína (en el interior de la esfera lipídica). Alrededor del virus se representa la organización de dicho genoma ARN y la correspondencia entre genes codificantes y proteínas. Desde el punto de vista de este artículo, las proteínas que se deben destacar son la de espícula (S, spike), responsable de reconocer el receptor de membrana que le permite infectar sus células diana, y la nucleoproteína (N, nucleocapsid), que permite el correcto empaquetamiento del ARN de unos 32000 nucleotidos que constituye su genoma. Esta figura está tomada del portal educativo del Protein Data Bank PDB-101 (https://pdb101.rcsb.org/learn/ flyers-posters-and-other-resources/flyer/sars-cov-2-genome-and-proteins).

En este artículo se describe de forma sencilla cómo producir proteínas con poder inmunogénico y, por tanto, ser capaces desencadenar una respuesta basada en anticuerpos, utilizando diferentes sistemas recombinantes. Tras una descripción de la estrategia general más comúnmente seguida, se pasa a explicar con algunos ejemplos cómo puede producir proteínas de SARS-CoV-2, inmunotoxinas y diferentes proteínas tóxicas.

#### Proteínas recombinantes: la clave está en el ADN

La producción de una proteína recombinante es un proceso relativamente sencillo. En primer lugar, se necesita conocer la secuencia de la proteína, un concepto que se refiere al orden en el que aparecen los aminoácidos que la componen, leído desde su extremo amino-terminal (la mayoría de las proteínas están constituidas por cadenas de aminoácidos que tienen dos extremos con un grupo amino en uno de ellos y otro carboxilo, en el otro), que se puede obtener de la base de datos correspondiente. Luego, se amplifica el fragmento de ADN codificante a través de la PCR, utilizando el propio ADN del organismo productor o una copia obtenida a partir del ARNm. También se puede sintetizar de novo el ADN de interés, lo que es cada vez más común gracias a las innovaciones tecnológicas de química sintética. El siguiente paso es la inserción del fragmento de ADN en un plásmido adecuado para cada proteína y sistema recombinante empleado. Los plásmidos son moléculas de ADN no cromosómico que se replican y transmiten independientemente del ADN cromosómico. Los elementos imprescindibles de un plásmido son: un elemento que permita seleccionarlo, un sitio de multiclonaje y elementos de control de la transcripción del ARNm. La manipulación del ADN de interés en un sistema bacteriano es obligatoria para construir el vector y purificarlo con suficiente rendimiento y calidad.

## Plásmidos al servicio de la biotecnología

A pesar de su abundancia y promiscuidad en la naturaleza, los plásmidos que se emplean en la producción de proteínas recombinantes han sido manipulados de tal manera que son moléculas completamente artificiales. Por decirlo llanamente, son un puzle molecular de muy diversos elementos y segmentos de ADN, con funciones muy diferentes que, agrupados convenientemente, se convierten en una herramienta biotecnológica de primera magnitud. Independientemente del sistema recombinante

que finalmente se elija, es prácticamente obligatoria la manipulación del ADN de interés en un sistema bacteriano, con el fin de construir el vector adecuado (el plásmido final útil para producir la proteína deseada) y purificarlo con suficiente rendimiento y calidad.

Un plásmido artificial que se usa para producir proteínas recombinantes necesita tener ciertos elementos importantes (Figura 2). Uno de ellos es un elemento que debe permitir seleccionarlo, como la resistencia a antibióticos o la necesidad de un nutriente específico. También necesita un segmento de ADN llamado sitio de multiclonaje (multi cloning site o MCS) [1], que tiene enzimas que permiten el corta y pega mínimamente necesario para hacer ingeniería genética y poder manipular a voluntad fragmentos de ADN. Otros de los elementos importantes son los de control de la transcripción del ARNm, que permiten que éste sea sintetizado a partir del ADN y que se traduce posteriormente en proteínas. Estos elementos incluyen, mínimamente, sitios de origen y terminación de la transcripción de ese ARNm, así como una secuencia represora o promotora que permita, a voluntad, reprimir o inducir dicha transcripción.

Finalmente, necesita una secuencia reconocible como origen de replicación para que pueda ser amplificado y propagado de unas células a otras cuando se dividen.

### Producción recombinante paso a paso

Una vez construido el vector con todas las características requeridas para la correcta producción de la proteína elegida, y tras su amplificación en bacterias, hay que proceder a su introducción en una línea celular adecuada. Una operación que, en función de la naturaleza de las células elegidas, se denomina transformación (normalmente en microorganismos) o transfección (si se trata de líneas celulares). Esta es una operación delicada pues hay que transportar a través de la membrana plasmática de las células elegidas una molécula con una alta densidad de carga eléctrica negativa. Teniendo en cuenta que el interior de la bicapa lipídica es fuertemente hidrófobo, habrá que recurrir a estrategias de apantallamiento de esa carga y, simultáneamente, a la alteración de la permeabilidad de esta membrana celular. De forma muy general, se pueden dividir en técnicas basadas en procedimientos químicos, en los que esencialmente se emplean cationes divalentes (se habla entonces de células químicamente competentes), y

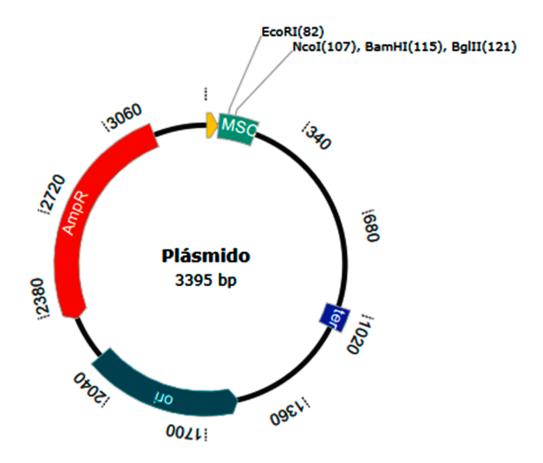


Figura 2. Se muestra el esquema general de un plásmido, con los elementos imprescindibles: elemento que permita seleccionarlo (AmpR), origen de replicación (ori), sitio de multiclonaje (MSC), elementos de control de la transcripción del ARNm (ter). Se destacan también algunas dianas reconocibles por enzimas de restricción.

aquellas que además se sirven de la ayuda de una descarga eléctrica que transporta el plásmido deseado al interior de las células (se trataría en este caso de células electrocompetentes). En ambos casos, tras este procedimiento, que supone un gran estrés para las células, es necesario un periodo de recuperación, seguido de una selección específica para distinguir las células supervivientes que hayan incorporado el plásmido deseado de aquéllas que no lo hayan hecho. Un tratamiento que se basa en una selección por resistencia a algún antibiótico o mediante la imposición de algún requerimiento nutricional o ambos, en función del diseño del vector que se haya empleado.

Llegados a este punto, se dispondrá de una línea celular en la que, bajo el control adecuado (incluido en forma de señales específicas en el vector construido) se podrá controlar a voluntad la producción de la proteína de interés sin más que crecer las células en los medios propicios y añadir las moléculas señalizadoras adecuadas en cada momento y circunstancia. Una vez acabado este proceso de producción, atendiendo a las características propias de cada sistema

recombinante empleado y, sobre todo, a las de cada proteína (cada proteína es distinta, es especial) se utilizarán técnicas estándar de purificación para conseguir aislar la proteína deseada [2].

## Cómo obtener un buen rendimiento

Otros aspectos importantes de todo este proceso, y que no se han mencionado todavía, pueden ser determinantes a la hora de obtener un buen rendimiento. Simplificando un tanto, tal vez sean tres los más importantes: la disponibilidad de los ARN de transferencia (ARNt); la localización subcelular o extracelular de la proteína de interés; y las modificaciones postraduccionales.

## a) La disponibilidad de los ARNt

Los ARNt son el descodificador molecular que es capaz de interpretar el código inscrito en la secuencia del ARNm y traducirlo en los aminoácidos que van a constituir cada proteína. Leen e interpretan los codones del código genético. Estos

codones están formados por asociaciones de tres nucleotidos (tripletes) en los que el único elemento que varía es la base nitrogenada que, en el ARN, puede ser adenina (A), la citosina (C), la guanina (G) o el uracilo (U) (Figura 3). La combinación de estas cuatro bases (cuatro letras) agrupadas de tres en tres da lugar a 64 posibles codones. Si se descuentan los tres que actúan como señal de parada en la traducción de proteínas, todavía quedan 61 disponibles para 20 aminoácidos. Necesariamente han de existir entonces codones sinónimos (Figura 3B), que presentan sesgo de especie. No son igualmente abundantes en los diferentes organismos. Un sesgo que lógicamente coincide con la abundancia relativa de los ARNt encargados de su descodificación y que hay que tener en cuenta a la hora de elegir el organismo productor de una proteína recombinante. Por este motivo, en muchos casos es recomendable preparar un ADN cuyo sesgo coincida con el organismo elegido y no con el del productor original natural. De esta forma, la relación ARNt/abundancia de codón será la óptima y el rendimiento de la producción será significativamente mayor.

## b) La localización subcelular o extracelular de la proteína de interés

No todas las proteínas aparecen en las mismas localizaciones subcelulares, lógicamente. Las células no solo las sintetizan, sino que las etiquetan para que determinados sistemas de transporte las trasladen a su localización final. Aquélla donde se las necesita para ejercer óptimamente su función. Los ejemplos más obvios, naturalmente, son los de las proteínas que portan un péptido señal para su integración en una membrana o, incluso, para su secreción extracelular. Este es un aspecto muy interesante y hay que considerarlo, no solo porque la producción de una proteína recombinante puede fracasar si la célula productora no la dirige a la localización correcta, sino porque también se puede sacar provecho de estas estrategias celulares. Etiquetar, por ejemplo, a una proteína citoplasmática, perfectamente hidrosoluble, con una péptido señal de secreción puede ser extraordinariamente útil. En primer lugar, fuera de la célula será completamente inocua. Pero, además, a la hora de purificarla, será mucho más sencillo si se encuentra fuera, en el medio de cultivo, que mezclada con el resto de las proteínas de las células productoras. En este caso, con una simple centrifugación se podrá separar el medio de cultivo, enriquecido en la proteína de interés.

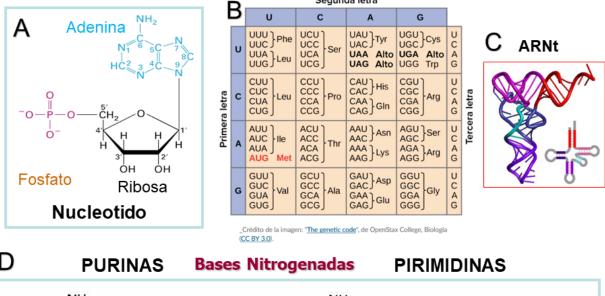
En una línea parecida, también puede ser útil etiquetar la proteína recombinante con un segmento polipeptídico, introducido artificialmente, que facilite tanto su detección (mediante el uso anticuerpos comerciales estandarizados) como su purificación (mediante cromatografía de afinidad). La batería de posibilidades en este sentido no deja de crecer y cada vez se dispone de un espectro mayor de posibilidades perfectamente establecidas y comercialmente disponibles.

## c) Las modificaciones postraduccionales

Una proteína plenamente funcional no es solo su cadena polipeptídica, no es un mero polímero de aminoácidos. Una gran mayoría sufren modificaciones postraduccionales. Un término que se refiere a cómo las células productoras introducen modificaciones químicas que tienen la propiedad de influir en su plegamiento, estabilidad, localización o, muy importante en el caso que ocupa, su inmunogenicidad. Se habla, por ejemplo, de la correcta formación de enlaces disulfuro o la adición, oportuna y específica, de moléculas de azúcares que decoran las proteínas una vez sintetizadas. Este último aspecto es especialmente importante pues la adición de estos azúcares es también específica de especie y suele jugar un papel clave en el reconocimiento entre proteínas. Por ejemplo, los azúcares de una proteína recombinante pueden ser clave en su inmunogenicidad debido a que su disposición y naturaleza es determinante de su reconocimiento por los anticuerpos del sistema inmune. En la misma línea, un virus con proteínas cuya glicosilación no fuese la esperada, sería incapaz de infectar a sus células diana pues, muy probablemente, vería comprometida su capacidad para reconocer los receptores de membrana necesarios. En resumen, la elección del organismo productor debe tener en cuenta también este tipo de modificaciones si se quiere tener éxito a la hora de diseñar una vacuna o un test de diagnóstico, por ejemplo.

## Tres ejemplos concretos

Con el fin de ejemplificar esta estrategia, a continuación se describen, muy brevemente, tres ejemplos concretos llevados a cabo en el laboratorio utilizando tres sistemas de producción recombinante de proteínas muy distintos, basados en la utilización de



Segunda letra



Figura 3. (A) Se representa la típica organización de un nucleotido; (B) El código genético. Repárese en cómo muchos aminoácidos pueden ser codificados por más de un codón; (C) La estructura tridimensional de un ARNt y su correspondiente proyección en el plano, con su característica distribución en forma de trébol; (D) La fórmula de las 5 bases nitrogenadas canónicas que suelen formar parte de un ácido nucleico.

bacterias (en el caso de la nucleoproteína de SARS-CoV-2), levaduras (para producir una inmunotoxina antitumoral) o una línea celular humana (que ha permitido sintetizar gran cantidad del dominio de unión al receptor de la proteína de espícula S, abreviado como RBD).

## 1. Producción en bacterias

La producción y purificación de la nucleoproteína (proteína N, Figura 1) de SARS-CoV-2 se llevó a cabo en el sistema de producción recombinante de proteínas mejor conocido, y también el más sencillo, que es el que constituye la bacteria Escherichia coli. Esta proteína N es la proteína estructural más abundante del SARS-CoV-2. Se une al ARN viral para formar un complejo de naturaleza ribonucleoproteica que empaqueta todo el genoma en una larga estructura helicoidal [3]. Es una proteína en la que se distinguen muy claramente dos dominios, amino y carboxilo terminal, unidos mediante un segmento de enlace muy rico en el aminoácido serina [4]. Al encontrarse

empaquetada en el interior del virus y no estar expuesto al medio exterior, se trata de un polipéptido que muestra muy pocos cambios entre las distintas variantes del coronavirus. Además, y por eso se eligió un sistema bacteriano, no sufre ninguna modificación postraduccional.

De esta forma, una vez conseguido el segmento de ADN adecuado, convenientemente adaptado al sesgo de codones de E. coli y etiquetado con una prolongación de seis histidinas, se clonó en un plásmido de la serie pET (<a href="https://www.snapgene.com/resources/">https://www.snapgene.com/resources/</a> plasmid-files/?set=pet\_and\_duet\_vectors\_(novagen)&plasmid=pET-28a(%2B)) que confería resistencia al antibiótico kanamicina. Estos plásmidos están diseñados para ser reconocidos no por la ARN polimerasa de la bacteria, sino por la del fago T7 (la secuencia promotora que permite la transcripción es la de este virus), una característica que permite un control estricto de la producción de la proteína de interés sin más que elegir una cepa bacteriana que no la contenga, como DH5aF', por ejemplo. Una vez propagado y amplificado el vector, se utilizó entonces para transformar bacterias de otra cepa, BL21(DE3). Una variante de *E. coli* que ha sido genéticamente modificada para que precisamente pueda reconocer la secuencia promotora vírica mencionada. Es una cepa que contiene el profago *lambda* DE3 que transporta precisamente el gen de la ARN polimerasa T7 bajo control de un promotor de lacUV5 (el promotor de los genes responsables de la degradación de la lactosa), permitiendo que la expresión de la ARN polimerasa T7 necesaria se pueda inducir sin más que añadir IPTG, un análogo de este disacárido. BL21(DE3) es además una cepa que no contiene dos proteasas cuya eliminación es clave para reducir la degradación de las proteínas recombinantes producidas.

Una vez producida la proteína, se lisaron las bacterias y, ayudándose de su etiqueta de seis histidinas, se utilizó una columna cromatográfica con el ion níquel inmovilizado en agarosa (Ni+2-NTA; una cromatografía de afinidad) para purificarla a homogeneidad en prácticamente una única etapa [5].

## 2. Producción en levaduras

La tecnología del ADN recombinante ha permitido desarrollar una amplia variedad de anticuerpos multiespecíficos y multivalentes con una actividad antitumoral potencialmente mejorada y una toxicidad asociada al fragmento Fc reducida [6]. Siguiendo con esta misma idea, el siguiente reto para potenciar aún más las funciones antitumorales de las construcciones basadas en anticuerpos es armarlas con una carga tóxica. Las inmunotoxinas (IMTX), proteínas quiméricas que combinan la capacidad de destrucción celular de una toxina con la especificidad de un anticuerpo monoclonal (mAb o una porción de dicho anticuerpo), constituyen una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer colorrectal, por ejemplo (Figura 4). En este sentido, en el laboratorio se ha diseñado toda una variedad de estrategias para producir IMTX recombinantes, funcionalmente activas contra los más frecuentes cánceres de colon humanos [6-8].

En este caso, la estrategia a seguir fue utilizar el sistema de expresión de proteínas basado en la levadura *Pichia pastoris*. Las levaduras son microorganismos eucariotas, de modo que *P. pastoris* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucariotas superiores, como el correcto procesamiento, plegamiento y modificación postraduccional de proteínas, incluyendo tanto la glicosilación como la

formación de los ya mencionados enlaces disulfuro, para los cuales posee rutas y enzimas específicas, normalmente relacionadas con la secreción de las proteínas de interés. Además, y con vistas a la utilización de sus productos en la terapia y diagnóstico de enfermedades humanas, es muy interesante destacar que se trata de un microorganismo considerado como GRAS (Generally Regarded As Safe). Es decir, seguro para los humanos.

Se puede destacar para el lector no especializado que el ejemplo más significativo de organismos GRAS son las bacterias utilizadas para producir yogures. Se usan desde tiempos ancestrales y no se sabe que hayan producido patología alguna. Y todo ello, en el caso de *P. Pastoris*, tratándose además de un organismo tan fácil de manipular como *E. coli*. Su utilización es más rápida, sencilla y barata que la de otros sistemas de expresión eucariotas y, por lo general, proporciona niveles de expresión más elevados. Estas características hacen que esta levadura sea muy útil como sistema de expresión de proteínas eucariotas y se esté convirtiendo en uno de los principales sistemas elegidos con este propósito.

### 3. Producción en una línea celular humana

La producción de proteínas recombinantes en células humanas se basa en el mismo principio fundamental que la producción en bacterias y levaduras: introducir un vector adecuado con el gen de interés en una línea celular capaz de expresar ese gen y producir la proteína, preferentemente en el medio extracelular. Utilizar líneas celulares humanas acarrea una serie de inconvenientes, siendo los más destacados el coste de los materiales necesarios para su cultivo y la complejidad de su manejo, ya que son más delicadas (por su mayor complejidad) que las bacterias o las levaduras y, entre otras peculiaridades, se requieren instalaciones más caras y sofisticadas para su cultivo. Pero tienen muchas ventajas frente a otros tipos de células eucariotas (como levaduras o células de insecto): son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales que otras células no pueden conseguir; obtener patrones de glicosilación adecuados, diferentes de los de otras células eucariotas; y, en general, procesar correctamente el plegamiento de la proteína de interés, incluyendo la formación de enlaces disulfuro, muy especialmente si se trata de una proteína humana o de una que se sintetiza y ensambla en un entorno humano, como las de SARS-CoV-2.

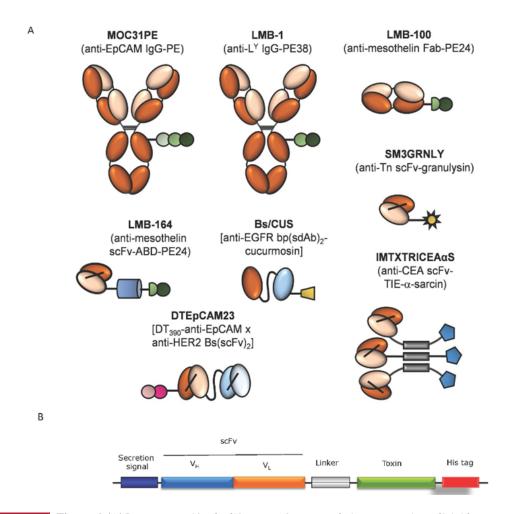
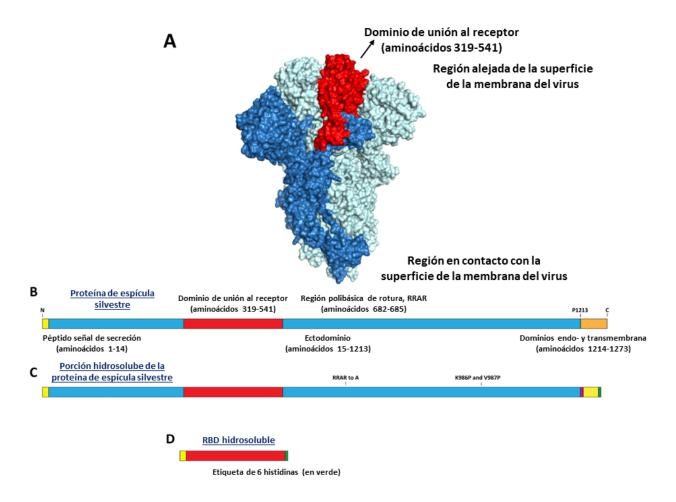


Figura 4. (A) Representación de diferentes formatos de inmunotoxinas dirigidas contra el cáncer colorrectal. (B) Esquema que muestra el diseño y la organización general de una inmunotoxina estándar. (Figura adaptada de Sanz et al [8]).

El sistema de expresión elegido fue la línea celular Expi293, basado en el cultivo de alta densidad de células humanas Expi293F, que derivan de la línea HEK293, células de riñón embrionario humano inmortalizadas, aisladas originalmente en los años 70, y que es una de las líneas celulares más utilizadas en la producción de proteínas. El sistema Expi293F permite la producción de proteínas con un alto rendimiento en comparación con otros sistemas. Además, las células crecen en un medio en suspensión, en lugar de adheridas a una placa de cultivo, lo cual facilita su manejo y su cultivo en alta densidad. Otra ventaja es que la proteína producida es liberada al medio extracelular, facilitando su posterior purificación. La expresión de la proteína es transitoria, lo cual significa que el vector que porta el gen de interés no se integra en el genoma de la célula y es necesario transfectar las células cada vez que se quieren producir las proteínas. Utilizando este sistema se produjo tanto la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 completa (S), incluyendo una serie de modificaciones que aumentan la estabilidad de la proteína y hacen que sea más soluble (Figura 5), como su dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) [9-13]. En ambos casos, se incluyó una etiqueta de seis histidinas en la secuencia de las proteínas para permitir su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

## ESFUNPROT: una plataforma con potencial para producir (casi) cualquier tipo de proteína

El grupo UCM de Estructura y Función en Proteínas (ESFUNPROT; https://www.ucm.es/grupoes-<u>funprot/</u>) dispone de la metodología y la experiencia necesarias para producir casi cualquier tipo de proteína en toda una batería de sistemas recombinantes que incluyen no solo las bacterias, levaduras y células humanas explicados en el cuerpo del artículo, sino otros, no comentados por falta de espacio, como plantas de tabaco o líneas celulares de insecto. Esta experiencia se retrotrae a más de tres décadas de producción de proteínas recombinantes con orígenes



**Figura 5.** (A) Representación de la proteína trimérica de espícula (S) del SARS-CoV-2 basada en PBD # 6VXX utilizando Pymol3. Un monómero está coloreado en azul oscuro mientras que los dos monómeros restantes se mantienen en azul claro. El dominio de unión al receptor (RBD) del trímero azul oscuro está resaltado en rojo. (B) Esquema de la proteína espiga de tipo silvestre de longitud completa con péptido señal, ectodominio, dominio de unión al receptor, sitio de escisión de furina, S1, S2 y dominio transmembrana y endodominio indicados. (C) Esquema de la espiga trimérica soluble. El sitio de clivaje polibásico/furina (RRAR) se sustituyó por una sola A. El dominio transmembrana y el endodominio se sustituyeron por un sitio de clivaje furina, un dominio de tetramerización T4 foldon y una etiqueta de seis histidinas. Se ha demostrado que la introducción de K986P y V987P estabiliza el trímero en la conformación de pre-fusión. (D) Esquema de la construcción del dominio de unión al receptor soluble. Todas las construcciones están a escala. (Figura adaptada de Amanat et al [12]).

muy diversos como pueden llegar a ser un virus, polen, un hongo, una anémona marina, una araña, una semilla o un ser humano, por solo citar los ejemplos con los que se tiene mayor experiencia acreditada. Este enfoque permite abordar la producción, estudio, modificación y utilización de una paleta de proteínas que prácticamente abarca todas las posibles del universo proteico, incluyendo la construcción de enzimas y quimeras que no existen en la naturaleza. De esta forma, se constituye la plataforma ideal para el lanzamiento de múltiples proyectos con finalidad terapéutica, diagnóstica, insecticida o enzimática. Al tratarse de proteínas aisladas, producidas de forma recombinante y bien caracterizadas, tienen la ventaja adicional de ser generalmente inocuas para el ser humano y completamente biodegradables. Es decir, constituyen sistemas perfectamente biosostenibles para el ambiente.

## Bibliografía

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989)
   Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.,
   Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- García-Segura, J. M., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, Á., Montero, F., Oñaderra, M., and Vivanco, F. (1996) Técnicas Instrumentales de Análisis Bioquímico, Síntesis, Madrid.
- 3. Sarkar, S., Runge, B., Russell, R. W., Movellan, K. T., Calero, D., Zeinalilathori, S., Quinn, C. M., Lu,

- M., Calero, G., Gronenborn, A. M., and Polenova, T. (2022) Atomic-Resolution Structure of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein N-Terminal Domain, J Am Chem Soc 144, 10543-10555.
- Satarker, S., and Nampoothiri, M. (2020) Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2, Arch Med Res 51, 482-491.
- 5. Torrijos Pulpón, C. (2022) Producción y Caracterización de la Nucleoproteína de SARS-CoV2, Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, p 39, Universidad Complutense de Madrid.
- 6. Tapia-Galisteo, A., SÁnchez RodrÍguez, I., Aguilar-Sopeña, O., Harwood, S. L., Narbona, J., Ferreras Gutiérrez, M., Navarro, R., Martín-García, L., Corbacho, C., Compte, M., Lacadena, J., Blanco, F. J., Chames, P., Roda-Navarro, P., Álvarez-Vallina, L., and Sanz, L. (2022) Trispecific T-cell engagers for dual tumor-targeting of colorectal cancer, Oncoimmunology 11, 2034355.
- Ruiz-de-la-Herrán, J., Tomé-Amat, J., Lázaro-Gorines, R., Gavilanes, J. G., and Lacadena, J. (2019)
   Inclusion of a Furin Cleavage Site Enhances Antitumor Efficacy against Colorectal Cancer Cells of Ribotoxin α-Sarcin- or RNase T1-Based Immunotoxins, Toxins (Basel) 11.
- 8. Sanz, L., Ibañez-Pérez, R., Guerrero-Ochoa, P., Lacadena, J., and Anel, A. (2021) Antibody-Based Immunotoxins for Colorectal Cancer Therapy, Biomedicines 9.
- Stadlbauer, D., Amanat, F., Chromikova, V., Jiang, K., Strohmeier, S., Arunkumar, G. A., Tan, J., Bhavsar, D., Capuano, C., Kirkpatrick, E., Meade, P., Brito, R. N., Teo, C., McMahon, M., Simon, V., and Krammer, F. (2020) SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup, Curr Protoc Microbiol 57, e100.

- 10. Esposito, D., Mehalko, J., Drew, M., Snead, K., Wall, V., Taylor, T., Frank, P., Denson, J. P., Hong, M., Gulten, G., Sadtler, K., Messing, S., and Gillette, W. (2020) Optimizing high-yield production of SARS-CoV-2 soluble spike trimers for serology assays, Protein Expr Purif 174, 105686.
- Del Fresno, C., Garcia-Arriaza, J., Martinez-Cano, S., Heras-Murillo, I., Jarit-Cabanillas, A., Amores-Iniesta, J., Brandi, P., Dunphy, G., Suay-Corredera, C., Pricolo, M. R., Vicente, N., Lopez-Perrote, A., Cabezudo, S., Gonzalez-Corpas, A., Llorca, O., Alegre-Cebollada, J., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Esteban, M., and Sancho, D. (2021) The Bacterial Mucosal Immunotherapy MV130 Protects Against SARS-CoV-2 Infection and Improves COVID-19 Vaccines Immunogenicity, Front Immunol 12, 748103.
- 12. Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G. A., Jurczyszak, D., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydillo, T., Miorin, L., Fierer, D. S., Lugo, L. A., Kojic, E. M., Stoever, J., Liu, S. T. H., Cunningham-Rundles, C., Felgner, P. L., Moran, T., Garcia-Sastre, A., Caplivski, D., Cheng, A. C., Kedzierska, K., Vapalahti, O., Hepojoki, J. M., Simon, V., and Krammer, F. (2020) A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans, Nat Med 26, 1033-1036.
- 13. Amanat, F., Thapa, M., Lei, T., Ahmed, S. M. S., Adelsberg, D. C., Carreno, J. M., Strohmeier, S., Schmitz, A. J., Zafar, S., Zhou, J. Q., Rijnink, W., Alshammary, H., Borcherding, N., Reiche, A. G., Srivastava, K., Sordillo, E. M., van Bakel, H., Personalized Virology, I., Turner, J. S., Bajic, G., Simon, V., Ellebedy, A. H., and Krammer, F. (2021) SARS-CoV-2 mRNA vaccination induces functionally diverse antibodies to NTD, RBD, and S2, Cell 184, 3936-3948 e3910.

# Vehiculización de vacunas mediante partículas de sílice



Bianca Dumontel

bdumonte@ucm.es

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (UCM). Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i + 12



Daniel Lozano Borregón

danlozan@ucm.es

Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)



María Vallet Regí

vallet@ucm.es

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (UCM). Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i + 12. Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)



Miguel Manzano García

mmanzano@ucm.es

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (UCM). Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i + 12. Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

n los últimos años las nanopartículas han adquirido un gran protagonismo en el área de la nanomedicina, puesto que presentan una gran versatilidad desde el punto de vista de composición, forma, tamaño y superficie exterior. Esto ha provocado que sean el centro de un gran número de investigaciones biomédicas, ya sea para el tratamiento de ciertas enfermedades, la prevención, el diagnóstico o incluso hasta en ingeniería de tejidos. Entre ellas, su aplicación en el desarrollo de vacunas ha adquirido mucho interés en los últimos años, ya que esta tecnología requiere de una cuidadosa selección del antígeno, un adyuvante eficiente y una ruta de administración viable. En este artículo se pretende subrayar el potencial que tienen las nanopartículas mesoporosas de sílice como vehículos de administración de vacunas y su habilidad para actuar como adyuvantes, incluyendo los retos más importantes a los que se enfrentará esta tecnología en los próximos años.

## Nanomedicina: una nueva disciplina

En las últimas décadas la nanotecnología se ha aplicado a diversos campos científicos, y su aplicación a la medicina ha dado lugar al nacimiento de una nueva disciplina científica denominada nanomedicina. Este campo de la medicina avanzada trata de resolver diversos problemas y deficiencias de la medicina convencional, como la escasa biodisponibilidad, la falta de especificidad de la diana, la toxicidad sistémica y orgánica, etc. Este campo, relativamente reciente, se ha convertido en un área científica multidisciplinar con muchos actores implicados, tales como ingenieros, físicos, químicos, biólogos, médicos o incluso legisladores.

Una de las ventajas de la nanomedicina es su escala nanométrica, que es precisamente la misma que muchos mecanismos biológicos del cuerpo humano. Este hecho permite que diversas nanoplataformas puedan atravesar algunas barreras naturales y, por tanto, acceder a nuevos lugares de administración o interactuar con el ADN o las proteínas a distintos niveles, en diferentes órganos, tejidos o células. Por todo esto, se espera que la nanomedicina sea un instrumento muy importante para la medicina personalizada, selectiva y regenerativa, gracias al desarrollo de nuevos tratamientos que podrían suponer un gran avance en la atención sanitaria.

Dentro del mundo de la nanomedicina, las nanopartículas han adquirido un gran protagonismo, puesto que presentan una gran versatilidad desde el punto de vista de su composición, forma, tamaño y superficie exterior, lo que hace que sean el centro de un alto número de investigaciones biomédicas. Sin embargo, y a pesar de las posibilidades que ofrecen, en la actualidad no existe un número muy elevado de terapias basadas en nanopartículas con aplicaciones clínicas,

con no más de 50 nanoformulaciones aprobadas y más de 100 en ensayos clínicos [1]. Ejemplos de formulaciones basadas en nanopartículas aprobadas en la clínica incluyen medicamentos contra el cáncer (Doxil, Abraxane, Myocet y MEPACT), agentes de contraste (Resovist), anestésicos (Diprivan), antifúngicos (AmBisome), fármacos de ARNi (ONPATTRO) y otras vacunas (Epaxal e Inflexal V).

Por otro lado, el rápido desarrollo de dos vacunas de ARNm para el COVID-19 basadas en nanopartículas lipídicas ha demostrado el gran potencial que las terapias con base en nanotransportadores pueden llegar a ofrecer. De hecho, el éxito de las vacunas contra el CO-VID-19 basadas en nanopartículas lipídicas ha iniciado una nueva oleada de actividades de investigación preclínica y clínica de sistemas con base en nanopartículas.

## Nanopartículas: una revolución tecnológica en medicina

Las nanopartículas son partículas realmente pequeñas, entre 1 y 100 nanómetros de diámetro, es decir, más pequeñas que 0.0000001 metros, por las que no se pueden observar ni siquiera con un microscopio óptico; por eso se necesita usar la microscopía electrónica. Para ver las dimensiones se suele utilizar la analogía de que una nanopartícula es a una pelota de tenis, lo que una pelota de tenis sería al planeta Tierra, más o menos, en términos comparativos de tamaño. Las nanopartículas pueden tener diversas formas, como esferas, barras, alambres, planos, estrellas, etc. En general, las nanopartículas presentan ciertas propiedades únicas que no se encuentran en sus homólogos macroscópicos, que incluyen una alta relación superficie-volumen, alta energía superficial, comportamientos mecánicos, térmicos, eléctricos, magnéticos y ópticos únicos, etc [2]. Estas propiedades las hacen adecuadas para una amplia gama de aplicaciones, que van desde la electrónica, a la recolección y almacenamiento de energía, a las comunicaciones, a la biología y a la medicina. Dentro de la anteriormente mencionada nanomedicina, las nanopartículas desempeñan un papel fundamental, ya que pueden transportar y administrar eficazmente agentes terapéuticos o materiales biológicos a lugares específicos, como un órgano, un tejido o incluso una célula determinada. Además, algunas de ellas poseen funciones activas que facilitan su uso como nanosondas para la obtención de imágenes/sensores.

La popularidad que las nanomedicinas están adquiriendo durante los últimos años puede explicarse, entre otras cosas, por las excelentes propiedades de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada de fármacos. En este sentido, las nanopartículas permiten formar dispersiones estables en medio acuoso de agentes terapéuticos activos poco solubles en agua, de forma que puedan administrase en un medio biológico. Además, los nanotransportadores permiten tener cierto control sobre el perfil farmacocinético de los agentes terapéuticos. Normalmente, en la administración convencional de un fármaco, siempre se suele tener un pico en la concentración de ese fármaco en la sangre, seguido de una bajada hasta la siguiente toma, donde se vuelve a dar un pico y así sucesivamente. En algunas ocasiones, esos picos pueden llegar a estar por encima del nivel de toxicidad y, otras veces, los mínimos por debajo de los niveles de eficacia. El uso de sistemas de liberación controlada permite mantener la concentración del fármaco en niveles óptimos durante todo el tratamiento.

Otro aspecto positivo del uso de esta tecnología es que el control de la composición, tamaño, forma o propiedades superficiales permiten la protección de los fármacos transportados evitando una posible biodegradación dentro del organismo por parte de los diversos sistemas endógenos de defensa, algo de especial relevancia, por ejemplo, en el transporte del RNA mensajero en las vacunas del COVID-19, ya que permite protegerlo de las nucleasas presentes en el cuerpo. El uso de nanopartículas para administración de fármacos también permite realizar terapias combinadas mediante la introducción de un coctel de diferentes agentes terapéuticos en un mismo sistema. Además, admiten desarrollar terapias dirigidas hacia determinados tejidos, órganos o células específicas de interés. Y, por último, ofrecen la posibilidad de incluir agentes de contraste para obtener una imagen biomédica, lo que puede ser de gran interés para una correcta diagnosis de ciertas enfermedades, como es el caso de ciertos tumores. Finalmente, el nanotransportador no debe presentar toxicidad y debe excretarse del organismo de forma segura para que pueda ser utilizado en la clínica.

## Un gran potencial poco explotado

Sin embargo, tal y como se ha mencionado anteriormente, y a pesar de su gran potencial y de toda la investigación que se ha llevado a cabo durante los últimos años, aún no hay en el mercado muchas nanomedicinas disponibles. En este sentido, la Figura 1 muestra algunas de las nanomedicinas aceptadas en los últimos años por las diversas agencias reguladoras [3]. Estas nanomedicinas aceptadas pueden

dividirse en cinco grandes grupos en función de su composición:

- Nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro, que se utilizan principalmente como agentes de contraste en técnicas de imagen por resonancia magnética para obtener información sobre la localización y dimensiones de posibles tumores.
- Liposomas y nanopartículas lipídicas, que son nanopartículas compuestas de fosfolípidos, el mismo material del que están hechas las membranas celulares, por lo que tienen excelentes propiedades de biocompatibilidad.
- 3. Polímeros terapéuticos, que incluyen nanopartículas hechas de polímeros biodegradables, como las nanopartículas de PLGA con diferentes fármacos encapsulados. La liberación del fármaco se producirá a medida que la nanopartícula se biodegrade en el organismo del paciente.
- Nanopartículas proteicas, en las que determinadas proteínas, como la albúmina, se utilizan para encapsular fármacos citotóxicos.
- 5. Conjugados fármaco-anticuerpo, que constituyen una categoría propia y en los que los anticuerpos guían los fármacos a tejidos diana específicos.

El hecho de que todavía haya tan pocas nanomedicinas en el mercado se debe a un conjunto de condicionantes en la traslación a la clínica, que es un proceso complejo, largo y muy costoso económicamente hablando. En este sentido, los obstáculos típicos para la traslación clínica de los diferentes proyectos y aproximaciones académicas que se llevan a cabo en los diferentes laboratorios de investigación en nanomedicinas suelen ser: la incapacidad de dirigirse a una necesidad clínica no satisfecha, los recurrentes problemas de reproducibilidad y caracterización de los nanomateriales implicados, la complejidad en el diseño que lo hace económicamente inviable, los problemas con el escalado industria, la falta de eficacia en humanos (puesto que la fisiología de los seres humanos difiere de la de los animales pequeños utilizados para los ensayos preclínicos), la posible toxicidad clínica inesperada, la falta de un argumento comercial convincente, una situación frágil con respecto a las patentes y posibles retrasos en su registro, la aglomeración en cierta enfermedades, como es el caso del cáncer, y el olvido de otras, como las enfermedades metabólicas. En líneas generales, para la industria farmacéutica, la falta de vías claras y estandarizadas para la aprobación reglamentaria de los nanosistemas hace que el desarrollo sea más arriesgado y, por lo tanto, menos atractivo, salvo que el mundo académico pueda demostrar estudios altamente convincentes en humanos.

## Nanoparticulas de sílice: transportadores multifuncionales

Además de las nanopartículas orgánicas anteriormente mencionadas, también ha aumentado sustancialmente el número de nanopartículas inorgánicas exploradas para desarrollar diferentes tipos de nanomedicinas. En particular, las nanopartículas de sílice se están estudiando como transportadores multifun-

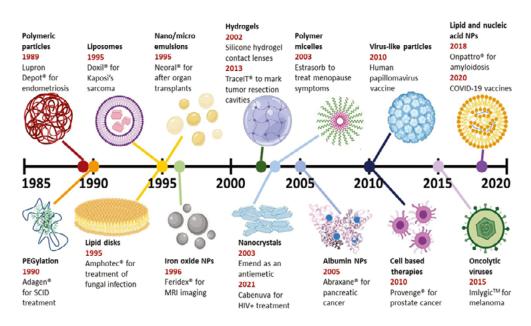


Figura 1. Diferentes nanomedicinas aprobadas por la FDA para su uso en humanos [3].

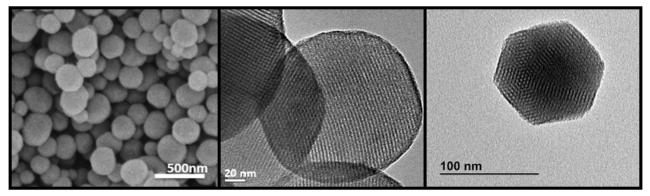


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (izquierda) y de transmisión (centro y derecha) de diferentes tipos de MSNs.

cionales en diversas aplicaciones biomédicas, ya sea para el diagnóstico o para la liberación controlada de fármacos [4]. En este sentido, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs, por sus siglas en inglés) con poros de 2-50 nm tienen propiedades beneficiosas, como una gran área superficial y formas y tamaños moldeables, lo que las convierte en una plataforma ideal para el diagnóstico y como vehículos para la administración de fármacos o genes [5]. En comparación con las nanopartículas orgánicas, las nanopartículas de sílice tienen una mayor capacidad de carga, sobre todo para productos biológicos, a la vez que protegen los fármacos encapsulados en el interior de los poros de una posible degradación, presentan una buena estabilidad mecánica y térmica y pueden ajustarse para controlar la liberación del fármaco en respuesta a estímulos internos o externos, gracias a la facilidad que tienen para ser modificados químicamente por la presencia de grupos silanoles en su superficie.

Las MSNs se producen gracias a la combinación de tres procesos de forma simultánea:

- 1. El proceso sol-gel, mediante el que logra la hidrólisis y condensación de los precursores de sílice que darán lugar a la red tridimensional de sílice.
- 2. El uso de una serie de surfactantes como agentes directores de la estructura para obtener las estructuras porosas ordenadas, de forma que los precursores de sílice van a consensar alrededor de las estructuras creadas por estos surfactantes en un mecanismo cooperativo, y tras eliminar estas plantillas, se formarán las cavidades o estructuras porosas.
- 3. Todo esto se realiza en unas condiciones de alta dilución, tal y como propone el método Stöber, y se podrá conseguir que, en lugar de formarse grandes macroestructuras, se formen nanopartí-

culas pequeñas y estables de sílice mesoporosa [6 y 7]. De esta forma, se pueden obtener MSNs esféricas con un tamaño de partícula definido entre 100 y 150 nm, aunque modificando ciertas condiciones, se pueden llegar a obtener más pequeñas (Figura 2), y con unos poros disponibles para ser cargados con agentes terapéuticos de unos 2 nm, aunque también pueden variarse las condiciones sintéticas para obtenerlos más grandes.

El concepto de introducir fármacos en el interior de los poros de los materiales mesoporosos para luego ser liberados en el organismo fue propuesto por primera vez por la profesora Vallet-Regí en 2001 [8]. Sin embargo, fue en 2010 cuando se pudo ver por primera vez de forma directa esos fármacos en el interior de los poros gracias a la utilización de un microscopio electrónico de muy elevada definición del Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la UCM [9].

## MSNs: una prometedora estrategia en el desarrollo de vacunas

Las vacunas tradicionales consisten en agentes patógenos atenuados o agentes patógenos inactivados que pueden provocar una fuerte respuesta inmunitaria. Sin embargo, las vacunas tradicionales pueden llegar a ser difíciles de administrar o pueden presentar ciertos efectos secundarios como inflamación en el lugar de la vacunación, requieren múltiples dosis para una inmunización eficaz o pueden llegar a ser muy caras. Se han desarrollado vacunas basadas en antígenos recombinantes purificados (proteínas o péptidos) que son más estables y presentan mejores perfiles de seguridad que las vacunas convencionales. Sin embargo, pueden tener una inmunogenicidad pobre y algunas pueden llegar a ser incapaces de atravesar los tejidos de la mucosa intestinal debido a su degradación por enzimas metabólicas. Para aumentar su inmunogenicidad se añaden adyuvantes a la formulación. Los adyuvantes son compuestos

que se añaden a las formulaciones de las vacunas para potenciar la activación de las células dendríticas (CD) y generar respuestas inmunitarias específicas fuertes. Los adyuvantes pueden clasificarse en dos categorías, dependiendo de si tienen un efecto inmunoestimulador en las células presentadoras de antígenos o funcionan como sistemas de administración que inician la captación del antígeno. Los adyuvantes aprobados para su uso en vacunas humanos incluyen sales minerales a base de aluminio, partículas similares a virus, glicolípidos, virosomas inmunopotenciadores, entre otros. En este sentido, uno de los aspectos más difíciles en el desarrollo de nuevas vacunas es la búsqueda de la combinación óptima de portador de antígeno y adyuvante.

Las nanopartículas mesoporosas de sílice han sido ampliamente estudiadas como portadoras de antígenos y adyuvantes para la administración de vacunas gracias a sus ventajas, entre las que se incluyen una superficie específica muy elevada, facilidad de modificación de la superficie, tamaño de partícula ajustable, excelente biocompatibilidad y robustez en comparación con otros nanotansportadores [10-13]. Además, la liberación de los agentes terapéuticos puede controlarse desde las MSNs gracias al desarrollo de sistemas inteligentes estímulo-respuesta que se han desarrollado en los últimos años [14].

El uso de MSNs en desarrollo de vacunas está muy ligado a su utilización como sistemas de liberación de proteínas, algo que se ha investigado profundamente durante los últimos años [7, 15 y 16]. El potencial de la sílice mesoporosa ordenada como adyuvante en vacunas fue propuesto por primera vez en el año 2006, cuando se investigó la SBA-15, un tipo particular de sílice mesoporosa ordenada con poros relativamente grandes, como un transportador de la proteína recombinante Int1β, demostrando una mejora en la respuesta inmune en un modelo murino [17]. Sin embargo, cuando se quiere trasladar esta tecnología a nanopartículas como MSNs, hay limitación del tamaño de los poros (ca. 2-10 nm), lo que puede llegar a restringir la adsorción de moléculas grandes, como es el caso del ADN o ciertas proteínas. En este sentido, se han evaluado dos estrategias diferentes: aumentar el tamaño de los poros o adsorber las macromoléculas en la superficie de las MSNs dejando disponible las cavidades mesoporosas para introducir agentes terapéuticos adicionales [18 y 19]. Es precisamente esta estrategia de adsorción superficial la que se está investigando en la actualidad en nuestro grupo de investigación para transportar diferentes plásmidos de ADN en el posible desarrollo de vacunas. Concretamente se está cargando ADN recombinante frente al virus SARS-CoV-2 para introducir en las células el gen correspondiente a un antígeno del virus que induzca protección frente a la infección del mismo. Se están obteniendo resultados muy satisfactorios y se espera que dentro de poco se puedan presentar a la comunidad científica.

## Biocompatibilidad, biodistribución y traslación a la clínica

Para las aplicaciones biomédicas in vivo es muy importante que las nanopartículas desempeñen la función deseada y no causen lesiones o anomalías histopatológicas. En este sentido, la sílice coloidal se ha venido empleando por la industria farmacéutica en la fabricación de comprimidos como aditivo para mejorar la fluidez durante décadas, por lo que es considerado como seguro por las diferentes agencias reguladoras. De hecho, el aditivo alimentario E551 está compuesto por nanopartículas de sílice de 100 nm [20].

Existen varias formulaciones basadas en nanopartículas de sílice que están siendo evaluadas en diferentes ensayos clínicos (Figura 3). Así, ciertas nanopartículas de sílice administradas de forma oral han demostrado ser bien toleradas sin efectos adversos serios, suponiendo una mejora en el perfil farmacocinético de ciertos fármacos hidrofóbicos [21-23]. También se han evaluado nanopartículas de sílice con núcleos de oro para terapia de resonancia plasmones para el posible tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tumores difíciles de tratar y lograr su ablación térmica [24-26]. Adicionalmente, en la Universidad de Cornell (EE.UU.), se han desarrollado nanopartículas de sílice extremadamente pequeñas (6-10 nm de diámetro) denominadas Cornell Dots, que pueden ser aplicadas como indicadores de ciertos tumores, como melanoma o tumores cerebrales malignos, y así poder detectar y localizar ciertos tumores en estadios tempranos [27 y 28]. Estos ensayos clínicos han subrayado el gran potencial que tienen las nanopartículas de sílice en diferentes aplicaciones biomédicas.

Gracias a sus resultados en ensayos clínicos, las nanopartículas de sílice se están perfilando como una prometedora herramienta de diagnóstico y administración de fármacos y podrían desempeñar un papel muy importante en el desarrollo de la nueva generación de nanomedicinas y nanovacunas en los próximos años. Para ello, será necesaria una investigación multidisciplinar con diferentes protagonistas implicados (químicos, físicos, ingenieros de materiales, biólogos, médicos y la industria farmacéutica) y así lograr acelerar la traslación de las MSNs del la-

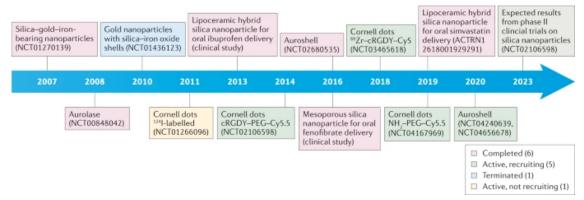


Figura 3. Ensayos clínicos de nanopartículas de sílice [20].

boratorio a la clínica para poder encontrar nuevas soluciones a viejos problemas y enfermedades.

## Bibliografía

- 1. A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic: An update, Bioeng. Transl. Med. 4 (2019) e10143.<u>https://doi.org/https://doi.org/10.1002/</u> btm2.10143.
- 2. G. Chen, I. Roy, C. Yang, P.N. Prasad, Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy, Chem. Rev. 116 (2016) 2826-2885.https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148.
- 3. C.J. Batty, E.M. Bachelder, K.M. Ainslie, Historical Perspective of Clinical Nano and Microparticle Formulations for Delivery of Therapeutics, Trends Mol. Med. 27 (2021) 516-519. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/i.molmed.2021.04.002.
- 4. M. Vallet-Regí, F. Schüth, D. Lozano, M. Colilla, M. Manzano, Engineering mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: where are we after two decades? Chem. Soc. Rev. 51 (2022) 5365-5451. https://doi.org/10.1039/D1CS00659B.
- 5. M. Manzano, M. Vallet-Regí, Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery, Adv. Funct. Mater. 30 (2020) 1902634. https://doi.org/10.1002/ adfm.201902634.
- 6. M. Manzano, M. Vallet-Regí, Mesoporous silica nanoparticles in nanomedicine applications, J. Mater. Sci. Mater. Med. 29 (2018) 65. https://doi. org/10.1007/s10856-018-6069-x.
- 7. M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights, Molecules.

- 23 (2018) 47. <a href="https://doi.org/10.3390/molecu-">https://doi.org/10.3390/molecu-</a> les23010047.
- 8. M. Vallet-Regi, A. Rámila, R.P. Del Real, J. Pérez-Pariente, A new property of MCM-41: Drug delivery system, Chem. Mater. 13 (2001) 308-311. https://doi.org/10.1021/cm0011559.
- 9. M. Vallet-Regí, M. Manzano, J.M. González-Calbet, E. Okunishi, Evidence of drug confinement into silica mesoporous matrices by STEM spherical aberration corrected microscopy. (1) Vallet-Regí, M.; Manzano, M.; González-Calbet, J. M.; Okunishi, E. Evidence of Drug Confinement into Silica Mesoporous Matrices by STEM Sphe, Chem. Commun. 46 (2010) 2956-8. https://doi. org/10.1039/c000806k.
- 10. M. Xuan, J. Shao, L. Dai, Q. He, J. Li, Macrophage Cell Membrane Camouflaged Mesoporous Silica Nanocapsules for In Vivo Cancer Therapy., Adv. Healthc. Mater. 4 (2015) 1645-1652. https://doi. org/10.1002/adhm.201500129.
- 11. B.G. Cha, J.H. Jeong, J. Kim, Extra-Large Pore Mesoporous Silica Nanoparticles Enabling Co-Delivery of High Amounts of Protein Antigen and Toll-like Receptor 9 Agonist for Enhanced Cancer Vaccine Efficacy, ACS Cent. Sci. 4 (2018) 484-492. https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00035.
- 12. Y. Lu, Y. Yang, Z. Gu, J. Zhang, H. Song, G. Xiang, C. Yu, Glutathione-depletion mesoporous organosilica nanoparticles as a self-adjuvant and Co-delivery platform for enhanced cancer immunotherapy., Biomaterials. 175 (2018) 82-92. https://doi. org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.025.
- 13. K.T. Mody, A. Popat, D. Mahony, A.S. Cavallaro, C. Yu, N. Mitter, Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine deli-

- very, Nanoscale. 5 (2013) 5167–5179. <a href="https://doi.org/10.1039/C3NR00357D">https://doi.org/10.1039/C3NR00357D</a>.
- R.R. Castillo, D. Lozano, B. González, M. Manzano, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery: an update, Expert Opin. Drug Deliv. 16 (2019) 415–439. https://doi.or g/10.1080/17425247.2019.1598375.
- M. Manzano, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Drug delivery from ordered mesoporous matrices, Expert Opin. Drug Deliv. 6 (2009) 1383–1400. <a href="https://doi.org/10.1517/17425240903304024">https://doi.org/10.1517/17425240903304024</a>.
- M. Colilla, B. González, M. Vallet-Regí, Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices, Biomater. Sci. 1 (2013) 114–134. https://doi.org/10.1039/C2BM00085G.
- 17. L.P. Mercuri, L.V. Carvalho, F.A. Lima, C. Quayle, M.C.A. Fantini, G.S. Tanaka, W.H. Cabrera, M.F.D. Furtado, D.V. Tambourgi, J. do R. Matos, M. Jaroniec, O.A. Sant'Anna, Ordered Mesoporous Silica SBA-15: A New Effective Adjuvant to Induce Antibody Response, Small. 2 (2006) 254–256. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.200500274.
- P. Mora-Raimundo, D. Lozano, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Nanoparticles to Knockdown Osteoporosis-Related Gene and Promote Osteogenic Marker Expression for Osteoporosis Treatment, ACS Nano. 13 (2019) 5451–5464. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b00241.
- 19. P. Mora-Raimundo, D. Lozano, M. Benito, F. Mulero, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Osteoporosis Remission and New Bone Formation with Mesoporous Silica Nanoparticles, Adv. Sci. n/a (2021) 2101107. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/advs.202101107.
- 20.T.I. Janjua, Y. Cao, C. Yu, A. Popat, Clinical translation of silica nanoparticles, Nat. Rev. Mater.
  6 (2021) 1072–1074. https://doi.org/10.1038/s41578-021-00385-x.
- 21. A. Tan, N.G. Eskandar, S. Rao, C.A. Prestidge, First in man bioavailability and tolerability studies of a silica-lipid hybrid (Lipoceramic) formulation: a Phase I study with ibuprofen., Drug Deliv. Transl. Res. 4 (2014) 212–221. https://doi.org/10.1007/s13346-013-0172-9.
- 22. K. Bukara, L. Schueller, J. Rosier, M.A. Martens, T. Daems, L. Verheyden, S. Eelen, M. Van Speybroeck, C. Libanati, J.A. Martens, G. Van Den Mooter,

- F. Frérart, K. Jolling, M. De Gieter, B. Bugarski, F. Kiekens, Ordered mesoporous silica to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs: Proof of concept in man, Eur. J. Pharm. Biopharm. 108 (2016) 220–225. <a href="https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.020">https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.020</a>.
- 23. T.R. Meola, A.Y. Abuhelwa, P. Joyce, P. Clifton, C.A. Prestidge, A safety, tolerability, and pharmacokinetic study of a novel simvastatin silica-lipid hybrid formulation in healthy male participants., Drug Deliv. Transl. Res. 11 (2021) 1261–1272. https://doi.org/10.1007/s13346-020-00853-x.
- 24.A.N. Kharlamov, A.E. Tyurnina, V.S. Veselova, O.P. Kovtun, V.Y. Shur, J.L. Gabinsky, Silica-gold nanoparticles for atheroprotective management of plaques: results of the NANOM-FIM trial, Nanoscale. 7 (2015) 8003–8015. https://doi. org/10.1039/C5NR01050K.
- 25. A.N. Kharlamov, J.A. Feinstein, J.A. Cramer, J.A. Boothroyd, E. V Shishkina, V. Shur, Plasmonic photothermal therapy of atherosclerosis with nanoparticles: long-term outcomes and safety in NANOM-FIM trial, Future Cardiol. 13 (2017) 345–363. https://doi.org/10.2217/fca-2017-0009.
- 26.A.R. Rastinehad, H. Anastos, E. Wajswol, J.S. Winoker, J.P. Sfakianos, S.K. Doppalapudi, M.R. Carrick, C.J. Knauer, B. Taouli, S.C. Lewis, A.K. Tewari, J.A. Schwartz, S.E. Canfield, A.K. George, J.L. West, N.J. Halas, Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116 (2019) 18590–18596. https://doi.org/10.1073/pnas.1906929116.
- 27. E. Phillips, O. Penate-Medina, P.B. Zanzonico, R.D. Carvajal, P. Mohan, Y. Ye, J. Humm, M. Gönen, H. Kalaigian, H. Schöder, H.W. Strauss, S.M. Larson, U. Wiesner, M.S. Bradbury, Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe, Sci. Transl. Med. 6 (2014) 260ra149 LP-260ra149. http://stm.sciencemag.org/content/6/260/260ra149.abstract.
- 28. D.K. Zanoni, H.E. Stambuk, B. Madajewski, P.H. Montero, D. Matsuura, K.J. Busam, K. Ma, M.Z. Turker, S. Sequeira, M. Gonen, P. Zanzonico, U. Wiesner, M.S. Bradbury, S.G. Patel, Use of Ultrasmall Core-Shell Fluorescent Silica Nanoparticles for Image-Guided Sentinel Lymph Node Biopsy in Head and Neck Melanoma: A Nonrandomized Clinical Trial, JAMA Netw. Open. 4 (2021) e211936–e211936. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.1936.



## Lucía de Juan Ferré

dejuan@ucm.es

Grupo de Investigación Vigilancia Sanitaria. Centro VISAVET (UCM)

## Vigilancia sanitaria de COVID-19 en animales y medio ambiente

os de los elementos que suscitaron especial preocupación al principio de la pandemia de COVID-19 (abril-mayo 2020) fueron el posible origen animal del virus y el potencial papel epidemiológico que los animales (especialmente las mascotas) pudieran tener en la transmisión y mantenimiento de SARS-CoV-2. El tándem mascotas y SARS-CoV-2 ha copado titulares y noticias en todo el mundo, principalmente como reflejo de la preocupación suscitada en la sociedad.

En este artículo se muestran las principales actividades desarrolladas por el grupo de investigación UCM Vigilancia Sanitaria y el Centro VISAVET en relación con la enfermedad COVID-19 en animales, destacando los proyectos, convenios de colaboración relacionados y las publicaciones científicas derivadas, así como la actividad docente y de divulgación.

## COVID-19 en mascotas

La Figura 1 resume las principales líneas de trabajo desarrolladas en esta pandemia, para dar respuesta a las principales preguntas sobre SARS-CoV-2 y mascotas.

## ¿Pueden las mascotas desarrollar una enfermedad como consecuencia de la infección por SARS-CoV-2?

Diferentes estudios han demostrado que existe una importante variabilidad en la susceptibilidad a la infección en las diferentes especies animales. Las investigaciones llevadas a cabo en los proyectos COV20/01385 y ANTICIPA UCM han demostrado que las mascotas se infectan a partir de personas enfermas, tanto por vía respiratoria como digestiva. Una vez infectadas, eliminan bajas cargas virales no observándose transmisión entre ellas y tampoco suponen riesgo para las personas. La enfermedad en los animales infectados, tanto de forma experimental como natural, cursa con un cuadro clínico leve, con lesiones respiratorias muy similares a las descritas en humanos.

## ¿Qué manifestaciones clínicas y lesiones se asocian a la infección por este coronavirus en animales?

Dada la relevancia que tienen los gatos como mascotas, evaluar la susceptibilidad de los gatos a la infección por SARS-CoV-2 emulando mecanismos de transmisión naturales se convirtió en una prioridad para dar respuesta a esta pregunta. Para ello, se realizó una infección mediante aerosol (simulando un estornudo/tos) y lamido (contaminando el pelaje del gato con el virus). Se confirmó así que los gatos pueden infectarse por el virus mediante rutas de transmisión comunes. También se realizó un análisis molecular, serológico e histológico de todos los animales infectados, encontrándose replicación del virus y lesiones significativas en varios tejidos, especialmente aquellos del tracto respiratorio (trabajo publicado en la revista Veterinary Research Communications [1]).

Uno de los grupos más susceptibles y que, de hecho, contiene una de las especies animales en las que más casos se han reportado a nivel mundial, son los mustélidos, en concreto los visones. En el ámbito de las mascotas, o animales en contacto con humanos, los hurones son los que más incógnitas suscitaron respecto a su susceptibilidad a SARS-CoV-2, el cuadro clínico que los animales podrían presentar y su capacidad de transmisión. Una de las investigaciones desarrolladas en este campo demostró la posibilidad de infección natural por SARS-CoV-2 en hurones cuando la circulación del

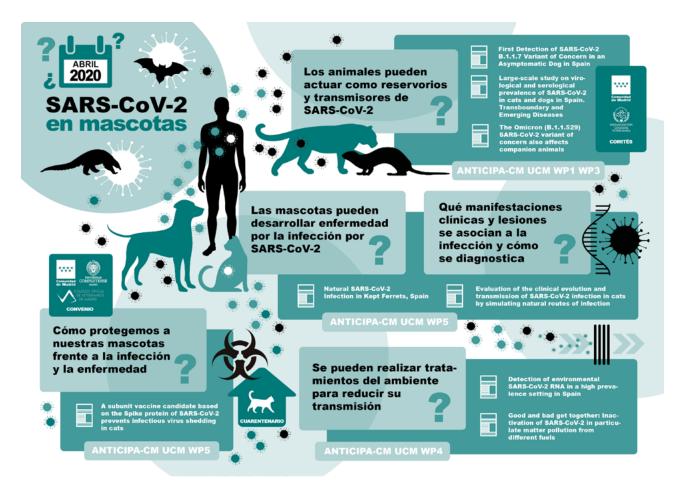


Figura 1. Principales líneas de trabajo relacionadas con COVID-19 en mascotas desarrolladas en el centro VISAVET durante esta pandemia.

virus entre humanos era alta (trabajo publicado en la revista Emerging Infectiouos Diseases [2]).

En el marco del proyecto ANTICIPA UCM, y como continuación de lo desarrollado en el proyecto COV20/01385, se ha realizado un experimento de infección in vivo con hurones para evaluar la susceptibilidad y lesiones generadas de manera comparativa entre la variante original de SARS-CoV-2 y la variante Ómicron, cuyos resultados están pendientes de publicación.

### ¿Cómo se diagnostica en animales?

Como base para poder llevar a cabo todas estas investigaciones y la labor desarrollada en el diagnóstico de COVID-19 en mascotas, se consiguió la puesta a punto y validación de técnicas diagnósticas en animales en un tiempo récord: aislamiento del virus, estudio molecular del virus, detección por PCR, detección por anticuerpos (ELISA) y seroneutralización, así como un sistema de muestreo que permitió la inactivación del virus.

En el campo de la divulgación se ha participado en artículos, entrevistas y congresos con el fin de dar difusión a los resultados obtenidos [11].

## ¿Pueden las mascotas actuar como reservorios y transmisores de SARS-CoV-2?

La evidencia científica ha puesto de manifiesto que, hasta la fecha, los animales, como el perro y el gato, pueden ser susceptibles a la infección por convivir con personas infectadas por SARS-CoV-2, si bien el número de casos confirmados a nivel internacional ha sido muy poco significativo si se compara con el número de casos descritos de personas propietarias de mascotas.

El proyecto titulado 'Estudio del potencial impacto del COVID-19 en mascotas y linces' (COV20/01385), liderado por el profesor José Manuel Sánchez-Vizcaíno (Centro VISAVET, UCM) y financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Instituto de Salud Carlos III en el que participan 5 centros de investigación (Centro VISAVET-UCM, Facultad de Veterinaria-UCM, Instituto de Salud Carlos III, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos y la Universidad de Córdoba),

Centros AVEM, Ingenasa y una amplia red de clínicas veterinarias y refugios municipales ha dado respuesta a esta pregunta. Dentro de los objetivos principales del estudio destacaba el de evaluar la presencia del SARS-Cov-2 en animales silvestres (linces) y mascotas (perros, gatos y hurones) y su papel epidemiológico como posible fuente de infección o reservorios a través de un amplio análisis epidemiológico, serológico, virológico y experimental (infección y transmisión) así como realizar un estudio de los mecanismos de infección y transmisión en mascotas y su patología. Respecto al primer objetivo, se estudiaron más de 2.500 animales y se analizaron más de 5.000 muestras de mascotas que habían convivido con personas sanas (no infectadas) o enfermos de COVID. Dentro de este proyecto en la Comunidad de Madrid, se han analizado más de 1.100 muestras para PCR hasta la fecha. Los resultados de este estudio a gran escala, sobre la frecuencia de detección de SARS-CoV-2 y prevalencia serológica en perros y gatos en España, se han materializado en una publicación en la revista Transboundary and Emerging Diseases [3]. De manera adicional, la identificación de las variantes de SARS-CoV-2 circulantes en la población de mascotas también era un factor de interés en este campo. La detección de las variantes Delta y Ómicron en animales de compañía ha dado lugar a la publicación de artículos en las revistas Viruses [4] y Frontiers in veterinary science [5 y 6], respectivamente. La labor desarrollada ha podido darse continuidad en el proyecto ANTICIPA UCM.

De manera adicional y con el fin de dar respuesta a esta pregunta, desde abril de 2020, cuando se constituyó el Comité COVID-19 de mascotas de la Comunidad de Madrid, se han seguido realizando esfuerzos para obtener datos fiables y actualizados, tanto de casos sospechosos como confirmados, que permitan tener una visión completa sobre la epidemiología de SARS-CoV-2 en las mascotas de la región. En el campo de la prevención y la gestión, en junio de 2020 se firmó un convenio de colaboración entre la Comunidad de Madrid, el Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid y la Universidad Complutense de Madrid, a través del Centro VISAVET, para promover medidas de sanidad animal y protección de las mascotas en el contexto de la pandemia generada por el COVID-19. Entre otras labores, dicho Comité abordó el análisis desde una perspectiva científica, así como anticiparse, en caso de ser necesario, a posibles escenarios futuros que pudieran afectar a las mascotas. Así mismo, se elaboró un protocolo de actuación para la toma de muestras, asistencia y seguimien-

to de casos susceptibles, sospechosos y confirmados entre la población animal de la Comunidad. El Centro VISAVET era el encargado de realizar los análisis laboratoriales oficiales en casos sospechosos de infección por SARS-CoV-2 en mascotas. Debido al éxito de este comité se ha renombrado como Comité Veterinario de Zoonosis y enfermedades emergentes con capacidad para asesorar a la autoridad competente ante las nuevas alarmas, habiendo ya demostrado su utilidad en las dos últimas alertas sanitarias, la de la viruela del mono y la de la enfermedad del Nilo Occidental. Además, diferentes miembros del grupo de investigación han formado parte de otros Comités relacionados como el Comité del Consejo General de Colegios Veterinarios.

## ¿Cómo se puede proteger a las mascotas frente a la infección de SARS-CoV-2 y la enfermedad?

Además de las medidas de manejo y prevención propuestas por parte de diferentes autoridades, como el protocolo de actuación para la toma de muestras, asistencia y seguimiento de casos susceptibles, sospechosos y confirmados entre la población animal de la Comunidad de Madrid, existía un interés sobre el estudio de nuevas aproximaciones para la prevención de COVID-19 en mascotas en caso de que fuera necesario. En el marco del proyecto COV20/01385 y su continuación con el proyecto ANTICIPA UCM se han evaluado diferentes propuestas inmunológicas para el control de coronavirus en mascotas.

Por ejemplo, se realizó un estudio en el que se evaluó un prototipo vacunal frente al virus SARS-CoV-2 en gatos. Dicho prototipo vacunal consistió en una vacuna de subunidades basada en la proteína de la espícula del virus (Spike, S). Este prototipo produjo una fuerte respuesta inmunitaria basada en anticuerpos neutralizantes en los gatos vacunados y fue efectivo para evitar la secreción del virus infeccioso por parte de los animales vacunados. Los resultados de este trabajo se han recogido en un artículo científico publicado en la revista Research in Veterinary Science [7].

En el campo de los adyuvantes y la inmunidad entrenada, se ha realizado un experimento de infección in vivo con ratones modificados genéticamente (k18-hA-CE2) para evaluar el efecto de dos adyuvantes inoculados por diferentes vías (oral e intravenosa) frente a la infección por SARS-CoV-2 a nivel de mortalidad, morbilidad, sintomatología, lesiones, etc. Los resultados de este experimento se encuentran en proceso de análisis.

## Tratamiento del ambiente contra la transmisión de SARS-CoV-2

Especialmente en los primeros meses de pandemia, existía una gran preocupación acerca del papel que el ambiente (mejor dicho, la contaminación ambiental) podía jugar en la transmisión de SARS-CoV-2. Una vez se demostró que la principal vía de transmisión de este coronavirus era la aerógena, las principales líneas de estudio se centraron en:

- El análisis de cómo el medio ambiente podía ser empleado como una fuente de información, por ejemplo, para poner de manifiesto la presencia y circulación del virus, es decir, la utilidad de los muestreos ambientales en la lucha contra este coronavirus. Un ejemplo de esta aproximación se encuentra en la publicación de la revista *Transboundary and Emerging Diseases* [8] sobre la detección ambiental del RNA de SARS-CoV-2 en una zona de alta prevalencia en España.
- 2. La evaluación de sistemas de tratamiento de inactivación ambiental. Para ello, en el marco de la colaboración en el proyecto 'PHOTO vs. SARS CoV-2. Validación del equipo SFEG-Aire Limpio frente a COVID-19', se ha realizado la evaluación de un equipo de filtración frente al SARS-CoV-2. Mediante un ensayo de aerosol y recuperación del virus, se demostró que el equipo inactivaba de manera efectiva el virus durante las distintas etapas de filtración.
- 3. El efecto de la contaminación ambiental en el mantenimiento de la capacidad infectiva del virus. Se evaluó la persistencia y capacidad infectiva del SARS-CoV-2 en partículas contaminantes (combustibles y material particulado atmosférico asociado). El virus permanece infectivo en las partículas contaminantes del aire, pero es inactivado por las partículas del combustible. Sin embargo, aunque las partículas del combustible inactivan el SARS-CoV-2, la conclusión del estudio es que tanto las partículas atmosféricas contaminantes como el del escape de los motores tienen un impacto negativo en la salud humana con implicaciones para el CO-VID-19 y otras enfermedades. La información sobre este estudio se puede ampliar en la publicación de la revista Science of the total environment [9].

En el ámbito de las actividades futuras, los estudios no se han interrumpido y continúan los trabajos en las siguientes líneas:

- Estudios de inmunoprotección basados fundamentalmente en la cooperación de la inmunidad innata y adquirida, que además pueda ser aplicada a otros patógenos.
- 2. Estudios de factores predisponentes que incrementen la severidad de la infección, aplicables así mismo a otros agentes con actividad proinflamatoria.
- 3. Estudio de fármacos que limiten la gravedad de estos agentes con actividad proinflamatoria.
- 4. Continuar participando en el Comité Veterinario de Zoonosis y Enfermedades Emergentes en colaboración con la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid y el Colegio de Veterinarios de Madrid dotándole de una mayor capacidad de actuación y de análisis y prevención de riesgos futuros.

## VISAVET: laboratorio de contención biológica clave en la lucha contra la pandemia de COVID-19

La gestión de la pandemia de COVID-19 requería una información sobre el estado infectivo de la población que inicialmente chocó con la saturación de sistemas sanitarios y su capacidad diagnóstica. En este escenario surgieron iniciativas de apoyo diagnóstico como la del Laboratorio COVID-19 de la Universidad Complutense de Madrid, una red de laboratorios dedicados a la realización de pruebas PCR para la detección del virus, que centró su actividad en analizar muestras procedentes de residentes y trabajadores de las residencias de la Comunidad de Madrid. En esta red de laboratorios, así como en el desarrollo del programa informático CompluPCR impulsado por el Vicerrectorado de Tecnología y Sostenibilidad de la Universidad Complutense de Madrid participó VISAVET con objeto de contar con un software libre disponible para redes de laboratorios de análisis por PCR de SARS-CoV-2.

El centro VISAVET formó parte de esta red de laboratorios para el diagnóstico de COVID-19 como infraestructura de especial relevancia en su vertebración, al contar con instalaciones de contención biológica de nivel 3 (BSL-3) donde se pudo centralizar la extracción de material genético de las muestras para su posterior análisis por PCR y validación diagnóstica en otros laboratorios de la red.

Sin embargo, la capacitación para el desarrollo de estas actividades no solo dependió de las características de

biocontención de las instalaciones, siendo de vital importancia poder contar con el personal técnico cualificado necesario y el cumplimiento de unas prácticas de laboratorio de acuerdo con el manual de calidad y bioseguridad del centro, capacidades que permiten la acreditación bajo normas estrictas de calidad y que garantizan la validez de sus resultados diagnósticos.

VISAVET se constituyó como punto de recepción de las muestras biológicas, registrando su entrada mediante un sistema de gestión de la información LIMS (Laboratory Information Management System), integrado en el sistema de calidad, que dio soporte al flujo de datos de los análisis de COVID-19, desde la recepción de las muestras hasta la emisión de los informes de resultados. Este sistema era compatible con los entornos de trabajo que requieren las instalaciones de contención biológica y procedimientos de bioseguridad y bioprotección, y su arquitectura flexible permitió su disposición remota a los distintos laboratorios participantes de la red con el fin de centralizar la información relativa a los análisis realizados a las muestras, los resultados obtenidos y el posterior tratamiento de datos. Este desarrollo ha ayudado, asimismo, a los procesos que garantizan la calidad de los análisis realizados, disponiendo de referencias únicas que permiten la trazabilidad de los datos en todo momento, minimizando los posibles errores en la transcripción de las mismas y permitiendo un flujo anonimizado de datos que permite la confidencialidad de estos.

El Laboratorio COVID-19 de la Universidad Complutense de Madrid realizó en casi tres meses análisis a residentes y empleados de más de 200 centros residenciales que remitieron más de 30.000 muestras para su análisis y se remitieron más de 700 informes de resultados.

Por otro lado, las infraestructuras capacitan al centro para su subcontratación en la realización de otros proyectos de investigación relacionados, como, por ejemplo, con el tratamiento de la enfermedad mediante el uso de ensayos preclínicos en animales.

En relación con las actividades de diagnóstico del Laboratorio COVID-19 UCM se ha participado con diferentes artículos y comunicaciones en medios de divulgación [11].

## Docencia y divulgación sobre COVID-19

La labor docente y divulgativa desarrollada en esta pandemia constituyen elementos clave en la transmisión de información a la sociedad que se han materializado en la organización y participación en cursos, seminarios o la publicación de artículos divulgativos o entrevistas en medios de comunicación.

Dentro de la actividad de formación destacan los siguientes cursos:

- Curso epidemias, zoonosis y pandemias. Una visión holística "One Health". Cursos de verano de la Universidad Complutense. Edición 2021. El Escorial, 7-9 julio de 2021. (Organizado).
- Curso One Health: coronavirus, animales y humanos. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Madrid. 3 de octubre de 2022. (Participación).

Respecto a la actividad de divulgación, esta se inició de forma paralela a las primeras noticias de la enfermedad y ha sido continuada hasta la fecha comprendiendo la publicación de artículos, entrevistas, participación en congresos y seminarios [11].

## Bibliografía

- 1. Barroso-Arévalo S\*, Sánchez-Morales L, Barasona JA, Rivera B, Sánchez R, Risalde MA, Argullo-Ros I, Sánchez-Vizcaíno JM. Evaluation of the clinical evolution and transmission of SARS-CoV-2 infection in cats by simulating natural routes of infection. Veterinary Research Communications, 46(3):837-852, 2022, ISSN: 0165-7380, DOI: 10.1007/s11259-022-09908-5.
- 2. Gortazar C\*, Barroso-Arévalo S, Ferreras-Colino E, Isla J, de la Fuente G, Rivera B, Domínguez L, de la Fuente J, Sánchez-Vizcaíno JM. Natural SARS-CoV-2 Infection in Kept Ferrets, Spain. Emerging Infectious Diseases, 27:7. 2021. ISSN: 1080-6040. DOI: 10.3201/eid2707.210096.
- 3. Barroso-Arévalo S\*, Barneto A, Ramos AM, Rivera B, Sánchez R, Sánchez-Morales L, Pérez-Sancho M, Buendia A, Ferreras E, Ortiz-Menendez JC, Moreno I, Serres C, Vela C, Risalde MA, Domínguez L, Sánchez-Vizcaíno JM. Large-scale study on virological and serological prevalence of SARS-CoV-2

- in cats and dogs in Spain. Transboundary and Emerging Diseases, 69(4):e759-e774. 2022. ISSN: 1865-1674. DOI: 10.1111/tbed.14366.
- Barroso-Arévalo S\*, Rivera B, Domínguez L, Sánchez-Vizcaíno JM. First Detection of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Variant of Concern in an Asymptomatic Dog in Spain. Viruses, 13(7):1379. 2021. ISSN: 1999-4915. DOI: 10.3390/v13071379.
- Barroso-Arévalo S\*, Sánchez-Morales L, Pérez-Sancho M, Domínguez L, Sánchez-Vizcaíno JM. First Detection of SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant of Concern in a Symptomatic Cat in Spain. Frontiers in veterinary science, 9:841430. 2022.ISSN: 2297-1769. DOI: 10.3389/fvets.2022.841430.
- Sánchez-Morales L\*, Sánchez-Vizcaíno JM, Pérez-Sancho M, Domínguez L, Barroso-Arévalo S.
   The Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant of concern also affects companion animals. Frontiers in veterinary science, 9:940710. 2022. ISSN: 2297-1769. DOI: 10.3389/fvets.2022.940710.
- Barroso-Arévalo S, Sánchez-Morales L, Domínguez M, García-Seco T, Risalde MA, García-Bocanegra I, Domínguez L, Sánchez-Vizcaíno JM. A subunit vaccine candidate based on the Spike protein of SARS-CoV-2 prevents infectious virus shedding in cats. Research in Veterinary Science, 148:52-64. 2022. ISSN: 0034-5288. DOI: 10.1016/j. rvsc.2022.05.003.

- 8. Fernández de Mera IG, Rodríguez del Río FJ, de la Fuente J, Pérez-Sancho M, Hervás D, Moreno I, Domínguez M, Domínguez L, Gortázar C\*. Detection of environmental SARS-CoV-2 RNA in a high prevalence setting in Spain. Transboundary and Emerging Diseases, 68(3):1487-1492. 2021. ISSN: 1865-1674. DOI: 10.1111/tbed.13817.
- De la Fuente J\*, Armas O, Barroso-Arévalo S, Gortázar C, García-Seco T, Buendia A, Villanueva F, Soriano JA, Mazuecos L, Vaz-Rodrigues R, García-Contreras R, García A, Monsalve-Serrano J, Domínguez L, Sánchez-Vizcaíno JM. Good and bad get together: Inactivation of SARS-CoV-2 in particulate matter pollution from different fuels. Science of the total environment, 844:157241. 2022. ISSN: 0048-9697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157241.
- Gortázar C, Rodríguez del Río FJ, Domínguez L, de la Fuente J. Host or pathogen-related factors in COVID-19 severity? The Lancet, 396(10260):1396-1397. 2020. ISSN: 0140-6736. Impact factor: 79.321. Category: Medicine, General & Internal, Quartile: 1, Position: 2 of 169. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32215-7.
- 11. VISAVET. Comunicaciones y artículos de divulgación sobre COVID-19 en otros medios <a href="http://www.visavet.es/data/prensa/Divulgacion\_CO-VID-19\_VISAVET\_Enero-2023.pdf">http://www.visavet.es/data/prensa/Divulgacion\_CO-VID-19\_VISAVET\_Enero-2023.pdf</a>





## Lourdes Calvo Garrido

lcalvo@ucm.es

Catedrática de Ingeniería Química, Facultad de CC. Químicas (UCM)

# Desinfección y esterilización de materiales sanitarios con CO<sub>2</sub> supercrítico

a esterilidad de un producto u objeto significa la ausencia completa de microorganismos viables. Actualmente se requiere un nivel de aseguramiento de esterilidad de 10<sup>-6</sup> (SAL6) para procedimientos de esterilización, es decir, una probabilidad de no más de un microorganismo viable en un millón de artículos esterilizados del producto final. Como bioindicadores del grado de esterilización logrado, se utilizan tiras de esporas, por ser las formas microbianas más resistentes.

Las técnicas de esterilización de material sanitario más utilizadas son los tratamientos térmicos: autoclavado con vapor húmedo o calor seco. Pero pueden causar múltiples alteraciones en materiales termosensibles e hidrolíticos. De hecho, no son aplicables en muchos biomateriales, instrumental y equipo médico de diagnóstico o de protección. Para estos casos, se usa irradiación gamma o la esterilización mediante agentes químicos, tales como atmósferas de óxido de etileno o formaldehído y plasma de peróxido de hidrógeno. Pero estos compuestos son tóxicos, químicamente agresivos y podrían dejar residuos en los materiales en contacto. Por otro lado, estos métodos requieren de la presencia de una atmósfera húmeda y prolongados tiempos de exposición.

Alternativamente, se propone el uso de CO2 supercrítico (CO2sc) porque aplicado a presión de 100 bar es muy eficaz para inactivar bacterias, hongos y virus y esporas resistentes [1]. Como agente esterilizante tiene muchas ventajas: no es tóxico ni reactivo, está muy disponible (de hecho, está en exceso siendo un subproducto de otros procesos industriales) y en esta aplicación se reutiliza. Es barato, inodoro y gas en condiciones atmosféricas, por lo que no deja residuos en el

producto final. Ya se utiliza en el envasado aséptico de alimentos.

En la esterilización con CO<sub>2</sub>sc, el producto se introduce dentro de un recipiente de alta presión, como se muestra en el esquema de la Figura 1. El CO, presurizado y precalentado se pone en contacto con el producto durante un tiempo determinado para lograr la descontaminación biológica deseada. El recipiente se despresuriza y el CO2 se elimina como gas. El producto estéril se recoge para su posterior uso o envasado. En la Figura 1 se incluye una imagen de una unidad portátil de sobremesa de 1 L de capacidad que se dispone en el departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid.

El mecanismo de acción antibacteriana se ha asociado a la penetración de CO, a través de la membrana celular permeable, para causar múltiples trastornos intracelulares, tales como la modificación de la membrana celular, disminución del pH, inactivación de enzimas clave, inhibición del metabolismo celular, trastorno del equilibrio electrolítico, extracción de componentes vitales... [2]. En esporas, el mecanismo de acción del CO, parece ser el daño directo a la estructura. Con análisis de citometría de flujo, se ha demostrado que la permeabilidad de la membrana interna y de la corteza aumenta. Paralelamente, la liberación del ácido dipicolínico (DPA) al medio y las imágenes de microscopía electrónica han mostrado claras evidencias de daños en la estructura y de cambios en la morfología [3]. En el caso de virus, se han identificado diferentes mecanismos de inactivación, como daños en la membrana, defectos de germinación y fugas de ácido dipicolínico [4].

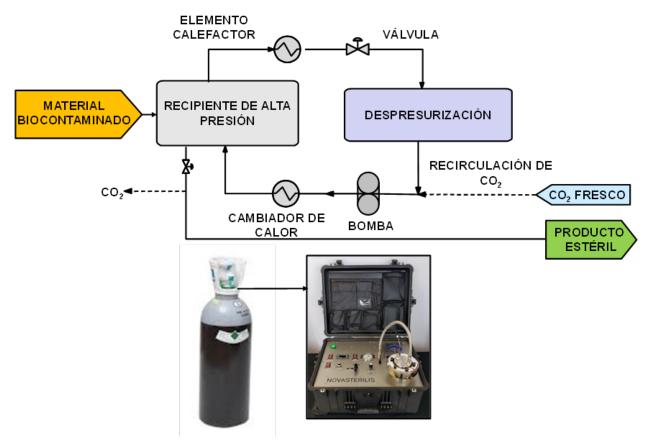


Figura 1. Esquema del proceso de esterilización con CO2 supercrítico y equipo portátil sobremesa de la UCM.

## Esterilización con CO<sub>2</sub> supercrítico de materiales sanitarios

La dificultad de esterilización con CO2sc de los materiales sanitarios reside en que la mayoría son termosensibles e hidrolíticos. Sin embargo, los bioindicadores esporulados no empiezan a inactivarse en contacto con este fluido hasta no superar los 80°C [5]. Consecuentemente, para la esterilización de estos productos es necesario complementar la acción del CO2sc con pequeñas cantidades de aditivos. Los mejores resultados se han obtenido con compuestos químicos que se utilizan comúnmente como bactericidas o esporicidas incluyendo ácidos, alcoholes y agentes oxidantes. De esta forma, se han conseguido esterilizar muchos tipos de biomateriales a temperaturas por debajo de los 40°C, incluyendo injertos, biopolímeros, tejidos biológicos, hidrogeles, plasma, fármacos, etc.

Por ejemplo, hay varios estudios en biopolímeros que se utilizan como andamiajes para implantes. En polietileno de ultra alto peso molecular se lograron inactivar todos los microorganismos inoculados a 37°C y 170 bar, mezclando el CO<sub>2</sub>sc con peróxido de hidrógeno y otros modificadores (etanol y agua) sin causarle daños [6]. Asimismo, se consiguió la esterilización a 38°C y

85 bar de estructuras tridimensionales de cilindros de alginato/agarosa y de colágeno mineralizado con una mezcla de CO<sub>2</sub> y 0.25% de agua, 0.15% de peróxido de hidrógeno y 0.5 % de anhídrido acético [7].

Los dispositivos microfluídicos tienen potencial en numerosas aplicaciones biomédicas. Un material frecuente de fabricación es polimetilmetacrilato (PMMA). En un trabajo se estudió el efecto del tratamiento con CO<sub>2</sub>sc para su esterilización y se comparó con otras técnicas. En las condiciones optimizadas de esterilización a 120 bar, 40°C y 60 min, no se detectaron alteraciones de las principales propiedades del polímero, incluido el valor de temperatura de transición vítrea, Tg. Contrariamente, se detectó pérdida de la rugosidad superficial y cambios en los perfiles de microcanales [8].

En injertos de piel [9], tendones [10] y huesos [11,12], se demostró que con el tratamiento con CO2 y 800 ppm de una mezcla de ácido peracético (14%) y peróxido de hidrógeno (5%) era posible llegar al grado de esterilización SAL6 a 38°C, 100 bar y 60 min. En estos últimos trabajos se reporta que no se producen daños en las propiedades biomecánicas según ensayos de fluencia, densidad de hueso y reticulado de colágeno, se mantiene la biocompatibilidad según normativa ISO 10993 con test de irritación intracutánea, de sensibilización de la piel y de citotoxicidad, y se consiguen buenas propiedades de osteoconductividad y tolerancia.

Los hidrogeles tienen múltiples aplicaciones para encapsular fármacos, en rellenos dérmicos, visco suplementos, productos de ingeniería tisular, etc. Varios trabajos muestran que la esterilización con CO<sub>2</sub>sc es eficaz sin comprometer las propiedades viscoelásticas, el pH, el contenido de agua y la estructura de los geles. Además, los geles tratados con CO<sub>2</sub>sc son biocompatibles y no tóxicos [13].

Bertolini y colegas estudiaron tres tipos de catéteres comerciales biocontaminados con C.albicans, E.coli, P.aeruginosa y S.aureus, encontrando que el tratamiento a 40°C, 100 bar por 30 min inactivaba estos microorganismos sin afectar la superficie y sin promover una mayor adhesión celular [14].

En vestuario médico se probó la desinfección con CO, líquido presurizado a 70 bar para eliminar la enterobacteria fecal gram-negativa, escherichia coli y la gram-positiva micrococcus luteus consiguiéndose a 20°C y 65°C, respectivamente, en presencia de agua [15] o con 5% de isopropanol o triclosán [16]. Tras el tratamiento, no hubo modificaciones en la resistencia al apilamiento, tracción, abrasión y estabilidad dimensional de los tejidos. También se consiguió desinfectar textiles biocontaminados con aspergillus niger usando CO<sub>2</sub>sc mezclado con emulsiones acuosas de hidróxido de calcio al 5% a 150 bar y 40°C [17]. La limpieza en seco de tejidos con CO<sub>2</sub> líquido a 18-22°C y 50-70 bar es comercial en EE.UU. Desde hace años, en sustitución del cancerígeno, irritativo y tóxico percloroetileno, aún en uso en España. Ello abre la oportunidad de conseguir simultáneamente la desinfección y la limpieza de tejidos en lavadoras utilizando como disolvente CO<sub>2</sub> presurizado.

La presencia de microorganismos patógenos en los residuos sólidos clínicos (CSW) supone un reto para los centros sanitarios, lo que suscita preocupación por su esterilización eficaz para su manipulación segura y la eliminación de la transmisión de enfermedades infecciosas. Es más, supone un grave problema medioambiental. La pandemia de la COVID-19 ha duplicado los desechos plásticos, según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los residuos peligrosos, como mascarillas, guantes, agujas o pruebas PCR se han multiplicado por 10 y se espera que la campaña de vacunación masiva se traducirá en la generación de

unas 144.000 toneladas de residuos en forma de viales, jeringas y envoltorios en todo el mundo (https:// www.eldiario.es/catalunya/sociedad/reciclaje-residuos-hospitalarios-problema-agravado-pandemia-olvidado-leyes-obsoletas\_1\_9078732.html). Así que también se investigó el uso de CO, sc para inactivar staphylococcus aureus, enterococcus faecalis, bacillus subtilis y escherichia coli en CSW [18]. Las condiciones óptimas para la inactivación completa de estas bacterias fueron 200 bar, 60°C y 60 min. Esto permite inferir que el CO2 sc tiene el potencial de ser utilizado en la gestión de CSW para la manipulación segura y el reciclaje-reutilización de los materiales CSW.

En trabajos más recientes, se ha buscado combinar la esterilización con otras operaciones. En la espumación de polímeros, el CO2 a alta presión se absorbe en un polímero semi-cristalino en grandes cantidades (10-30% en masa) y es capaz de hincharlo rebajando su Tg. Al despresurizar, se libera el CO2 gaseoso generando estructuras porosas. Controlando la velocidad de despresurización, la presión y temperatura, es posible conseguir "esponjas" con huecos de tamaño y conectividad apropiados para utilizarse como estructuras tridimensionales en implantes. Aplicando este método en andamiajes de poli (ε-caprolactona) (PCL) y ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) se han logrado materiales estériles con morfologías mejores en comparación con la esterilización estándar por radiación gamma [19].

Por otro lado, el secado de hidrogeles con CO<sub>2</sub>sc es ampliamente utilizado en la industria para preparar aerogeles porosos. Aprovecha que el CO2 sc tiene densidad cercana a la de un líquido y es miscible con muchos disolventes orgánicos, de manera que puede extraer el disolvente orgánico del hidrogel. Además, la ausencia de interfase líquido-vapor en la mezcla supercrítica, hace que los poros no estén sometidos a ninguna presión capilar, evitando el colapso de los mismos durante el secado. Al ser los coeficientes de difusión de las mezclas supercríticas superiores a los de los líquidos y su viscosidad similar a las de los gases, se mejora la velocidad de extracción y se acelera el proceso de secado. En general, el secado supercrítico produce aerogeles que tienen mayores volúmenes de poros y porosidades y áreas superficiales más elevadas en comparación con la liofilización y el secado a presión ambiente. Bento et al. probaron el secado y la esterilización con CO2sc de aerogeles de alginato-gelatina en un proceso continuo e integrado. Tras el secado, utilizaron dos condiciones de esterilización: 100 y 250 bar a 35°C [20]. Los análisis químicos y térmicos mostraron que, a diferencia de la

esterilización en autoclave (método de comparación), la esterilización con CO<sub>2</sub>sc no provocó la degradación del aerogel. La porosidad, el diámetro de los poros y el área superficial disminuyeron a la mayor presión durante la esterilización con CO<sub>2</sub>sc, mientras que las propiedades mecánicas se conservaron cuando se aplicó la presión más baja. Los análisis microbiológicos demostraron también la eficacia de la esterilización, ya que fueron inactivados totalmente los microorganismos contaminantes naturales (bacillus spp.) de los aerogeles. Al final, esta estrategia innovadora permite obtener aerogeles de base natural esterilizados y listos para usar, con potencial para ser aplicados en medicina regenerativa.

Aunque la descelularización de tejidos nativos parece prometedora para obtener andamiajes, la descelularización adecuada de tejidos duros, poco penetrables y difusibles sigue siendo un reto, además de ser un proceso que requiere mucho tiempo. En un estudio reciente, se ha desarrollado un método de descelularización y esterilización mediante CO<sub>2</sub>sc precedido por un proceso de congelación/descongelación y de varias etapas de lavado, que demuestra la eficacia de la descelularización y una reducción sustancial del tiempo de producción/manipulación [21]. La evaluación histológica mostró un andamiaje parcialmente acelular, con preservación de glicosaminoglicanos y fibras de colágeno, aunque la cantidad de ADN residual seguía siendo superior a la del tejido descelularizado químicamente. Por el contrario, las propiedades biomecánicas del andamiaje eran similares a las del tejido nativo no descelularizado. Tras la esterilización con  ${\rm CO_2}$ sc, el resultado funcional simulado fue más similar al de la tráquea nativa, en comparación con la esterilización mediante irradiación gamma. Por lo tanto, este método podría satisfacer crecientes demandas de tejidos en otras aplicaciones, aunque por el momento es necesaria una mayor optimización del proceso.

## Esterilización con CO<sub>2</sub> supercrítico en el contexto de la pandemia COVID-19

Antes de la pandemia, ya se había demostrado la eficacia del tratamiento con CO<sub>2</sub>sc en distintas familias de virus (Tabla 1). Se había conseguido la esterilización de VIH1, sindbis, polio sabin I and pseudorabies sobre injertos de hueso a escala piloto [22,23] y de sindbis, parainfluenza, PHV1, vaccinia, VIH1 inyectados en productos plasmáticos a temperaturas de 32°C en pocos minutos [24]. Estaba incluso descrita la destrucción de más de seis órdenes de magnitud de coronavirus a 40°C y 160 bar en 30 min [25]. En condiciones más suaves (a 35°C, 100 bar y 15 min) y adicionando 55 ppm de ácido peracético al CO2sc, se había conseguido inactivar el virus de la encefalomiocarditis porcina [26]. De forma similar, se habían inactivado varios bacteriófagos con CO<sub>2</sub>sc a 85 bar y 38°C, modificado con una mezcla de agua (0.25%) peróxido de hidrógeno (0.15%) y anhídrido acético (0.5%) [27].

		Condiciones de aplicación del ${\sf CO}_2$			n del CO <sub>2</sub>	Reducción	Referencia
Virus	Medio	Presión	Temperatura	Tiempo	Aditivos	(log10)	
		(bar)	(°C)	(min)			
VIH-1	Aloinjertos	250	50	10 con flujo continuo de CO <sub>2</sub>	Ninguno	>4.1	
Sindbis (modelo de hepatitis C)		250	50				[22,23]
Polio sabin (modelo de hepatitis A)		250	50			>6.6	[22,23]
Pseudorabies (modelo de hepatitis B)		250	50			>4.0	
Sindbis	Plasma 2	250	32	150	Ninguno	6	[24]
Parainfluenza tipo 3		250	32			6.1	
Herpesvirus porcino 1 (PHV-1)		250	32			5.5	
Vaccinia		250	32			6.2	
VIH-1		250	32			5	
Coronavirus	160 160 160 160	160	40	30	Ninguno	>6.0	
Herpesvirus		160	40		Ninguno	>7.0	[25]
Flavivirus		160	40			>8.0	
Arterivirus		160	50			>9.0	
Encefalomiocarditis porcina	Matriz acelular porcina	94-100	35-41	15 con agitación	Ácido peracético (55 ppm)	>6.4	[26]
Bacteriófago MS2	Modelos 3D de				Agua (0.25%) +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.15%) +anhídrido acético (0.5%)	>6	[27]
Bacteriófago Phi X 174	implantes reabsorbibles	85	38	5		>6	

**Tabla 1.** Resumen de los trabajos previos a la COVID-19 de inactivación con  $CO_2$  supercrítico en virus en diversas condiciones, sobre distintos medios y con la utilización de aditivos.

Cuando apareció el coronavirus SARSCoV2 y hubo la drástica escasez de material sanitario de protección, se publicaron tres trabajos investigando la esterilización de equipos de protección facial para evaluar su posible reutilización.

En uno se analizó la inactivación de los coronavirus humanos SARS-CoV-2 y HCoV-NL63 en mascarillas quirúrgicas, mascarillas de tela y respiradores N95. Preliminarmente, se inoculó bacillus atrophaeus en diferentes entornos (seco, hidratado y saliva) para imitar la tos y los estornudos y servir como "peor caso" en relación con los EPI mencionados, consiguiéndose la esterilización con CO₂sc a 100 bar y 35°C modificado con un aditivo comercial basado en ácido peracético (NovaKill<sup>TM</sup>) en menos de 40 min. Después, se probó con los coronavirus inoculados en el respirador, y se determinó la actividad viral tras el tratamiento. Además, se investigó la capacidad de reprocesamiento de los materiales mediante pruebas de humectabilidad y mapeo de superficies. Los resultados mostraron una inactivación viral completa de ambos coronavirus. No se observaron cambios en la morfología, la estructura topográfica o la integridad de los materiales y, de acuerdo con la recomendación de la OMS, se mantuvo la humectabilidad tras el procesamiento [4].

En otro trabajo, se utilizaron mascarillas FFP2. Primero se seleccionaron las mejores condiciones, resultando ser de una hora a 70°C y 75 bar, donde al CO<sub>2</sub>sc se le adicionó una disolución biocida en 0.2% formada por etanol y peróxido de hidrógeno en partes iguales. Las FFP2 se probaron antes y después del tratamiento usando un indicador biológico (esporas de geobacillus stearothermophilus) con respecto a tres objetivos: (i) lavado de los depósitos orgánicos, (ii) esterilización y (iii) conservación de las prestaciones de filtración. El tratamiento propuesto cumplió con estos tres criterios, con una descontaminación eficaz de los bioindicadores y un lavado que preservaba los requisitos FFP2 de eficacia de filtración de aerosoles (94%) con una caída de presión aceptable (< 240 Pa) [28].

Finalmente, colegas de la Universidad de Santiago de Compostela, consiguieron la esterilización en mascarillas FFP3 contaminadas con endosporas de bacillus pumilus en condiciones de operación suaves (39°C y 100 bares durante 30 minutos) y con bajo contenido de H2O2 (150 ppm). Luego evaluaron las propiedades funcionales (eficacia de filtración bacteriana, transpirabilidad, resistencia a las salpicaduras, elasticidad de las correas) de las mascarillas procesadas tras 1 y 10 ciclos de esterilización. Demostraron que las propiedades fisicoquímicas de las mascarillas FFP3 permanecieron inalteradas tras el reprocesado sin encontrar diferencias de eficacia ni en los ensayos de filtración, ni en la integridad de la filtración [29].

## Investigación realizada en la Universidad Complutense de Madrid

En el grupo de Procesos en Fluidos Supercríticos de la Universidad Complutense de Madrid (https://www. ucm.es/leffs/sterilization) se ha investigado extensivamente la esterilización con CO2sc, con sendos proyectos financiados por Ministerio de Ciencia e Innovación MICINN (CTQ 201018537, 200609884), en la inactivación de varios agentes etiológicos típicos de infecciones de tipo bacteriano, tanto en forma vegetativa: salmonella, escherichia coli, staphilococcus aureus, legionella, como en forma esporulada (bacillus cereus, clostridium) en agua [30], alimentos líquidos [31] y sólidos [32].

Para la Dirección General de Armamento, Ministerio de Defensa, se investigó la inactivación de un simulante de Antrax (esporas de bacillus thuringiensis) en el equipo del combatiente NBQ (de protección nuclear, biológico y químico) y en varios dispositivos electrónicos de comunicación (radio, móvil y pen drive) [33]. Se perseguía descontaminar estos materiales tan sensibles, complejos y caros después de un hipotético ataque con armas biológicas. Las condiciones tan poco agresivas del tratamiento (150 bar, 40°C, 15 min) permitieron preservar la calidad de todos los tejidos técnicos y la funcionalidad de todos los dispositivos electrónicos, incluso después de varios ciclos de esterilización.

En el ámbito sanitario, se estudió la esterilización de staphylococcus epidermidis en gasas e implantes poliméricos 3D para su uso en revestimientos de prótesis de cadera (P202230220), ya que la infección por este microorganismo es la causa de muchos rechazos postquirúrgicos. Se utilizó el CO2 aplicándolo a 100 bar y una suave temperatura de 40°C por 30 min. Para conseguir el grado de esterilización, se agregaron pequeñas cantidades de aditivos al CO<sub>2</sub>. Pudo lograrse con 200 ppm de peróxido de hidrógeno o con 1000 ppm de agua. En la gasa, no se observaron cambios apreciables, pero en el implante polimérico aparecieron algunas oquedades y delaminaciones, visibles por microscopía electrónica (Figura 2). Además, hubo una reducción significativa en su Tg tras la absorción del CO2 y posterior liberación en forma gaseosa durante la despresurización. Sin embargo, ninguno de estos impactos tuvo consecuencias importantes en la macroestructura del

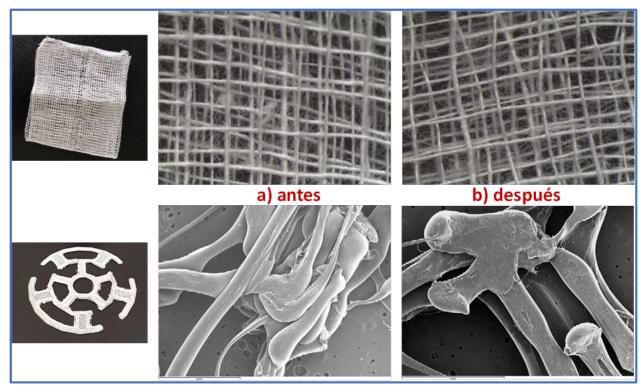


Figura 2. Gasa y recubrimiento polimérico 3D de cadera, a) sin tratar y b) esterilizados con CO<sub>25</sub>.

implante, que mantuvo su forma y tamaño con diferencias imperceptibles a simple vista. Por el contrario, la presencia de cavidades a nivel microestructural podría ser beneficiosa en términos de adhesión del implante a la prótesis [34].

Se acaba de registrar una solicitud de patente de un procedimiento para la obtención de colágeno tipo II o nativo a partir de cartílago de origen animal por contacto con CO<sub>2</sub>sc, en el que este fluido actúa como desengrasante, desinfectante y secante en un solo paso y sin intervención de disolventes orgánicos (EP202230606).

Ahora se está investigando la esterilización del EPI de seguridad biológica, para poderlo reutilizar o para poder recuperar sus componentes como materia prima, con el soporte de la Comunidad de Madrid y la Unión Europea, a través el Fondo REACT-EU, proyecto AN-TICIPA UCM (<a href="https://www.ucm.es/anticipa-ucm/">https://www.ucm.es/anticipa-ucm/</a>) (Figura 3). De momento, los resultados son prometedores. La esterilización con CO2sc, demostrada sobre tiras bioindicadoras de G. stearothermophilus y B. atrophaeus, no causa ningún daño al mono, gorro, mascarillas y cubre-botas, mientras que sí parece alterar algunos componentes de las gafas protectoras y los guantes de nitrilo. En el laboratorio de bioseguridad nivel 3 del centro VISAVET de la UCM, se está comprobando la inactivación del coronavirus SARS-CoV-2.

### Desarrollo comercial

Poco a poco la tecnología se ha ido desarrollando a escala comercial. Hay al menos dos ejemplos del uso de CO2sc en esterilización de biomateriales. BIOBank, en Francia está autorizada por la Agencia Nacional de Seguridad de Productos Sanitarios para la distribución de injertos óseos estériles utilizando un procedimiento basado en el uso de CO<sub>2</sub>sc (https://www.biobank. fr/). Los datos que aportan de eliminación de virus son del Instituto Pasteur. Australian Biotechnologies comercializa injertos tratados con CO2sc en la etapa final de esterilización (https://ausbiotech.com.au/resources/treatmenttechnology/). Pfizer ha explorado el uso de CO, para la esterilización de fármacos [35]. En los Estados Unidos, la empresa NovaSterilis comercializa equipos diseñados específicamente para la esterilización de biomateriales con recipientes de 1 a 80 L (https://www.novasterilis.com/).

## Una técnica que debería implementarse

La temperatura para la esterilización por CO<sub>2</sub>sc es baja y los tiempos se reducen significativamente respecto a otras técnicas. Es aplicable a materiales termosensibles e hidrolíticos de muy diversa naturaleza, incluyendo polímeros, biomateriales, fármacos, tejidos técnicos, equipos electrónicos, residuos, etc. Aunque

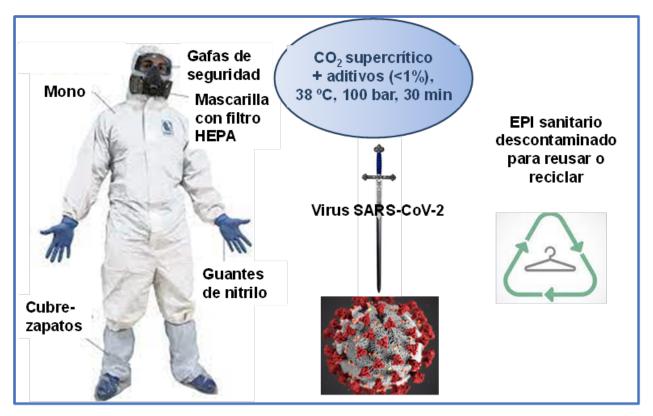


Figura 3. Objetivo del proyecto de esterilización con CO<sub>2</sub>sc ANTICIPA UCM. Esterilizar todos los elementos del EPI biológico para poderlo reutilizar o reciclar como materia prima.

es necesario desarrollar la normativa aplicable a un nuevo procedimiento de esterilización.

Los productos esterilizados por CO<sub>2</sub>sc se recuperan sin restos de productos químicos tóxicos, pudiéndose reutilizar según los objetivos de la economía circular. En los pocos casos en los que se ha observado alteración del material, sus componentes se podrían reciclar como materia prima, por ejemplo, algunos polímeros o componentes electrónicos. Cuando ninguna de estas opciones sea posible, los materiales así tratados, al menos ya no tendrían que ser considerados como residuos biológicos para incineración o autoclavado.

Otro aspecto muy relevante de esta técnica es que es posible llevar a cabo la esterilización combinada con extracción/descelularización (para injertos nativos) / secado en un solo equipo, cumpliendo con los principios de intensificación de procesos. En prendas textiles, se podría incluso combinar con la limpieza en seco en lavadoras como las que hoy existen en las tintorerías.

Consecuentemente, lo ideal es que esta técnica se estableciera como otra alternativa de esterilización a baja temperatura en hospitales, centros biotecnológicos, etc. Pero en este punto de desarrollo, donde ya está tan investigada en escala laboratorio, es necesaria la inversión privada para los siguientes pasos de escalado: validación, certificación, construcción de equipos y comercialización. En España se podría hacer porque hay varias ingenierías capaces de diseñar equipos a alta presión a todas las escalas. Es cierto, que serán caros en términos de primera inversión, pero la recuperación de materiales y dispositivos sanitarios de elevado precio, los beneficios medioambientales relacionados y los bajos costes de operación y de aditivos, acortarán mucho el plazo de amortización.

Con el desarrollo de esta tecnología se pretende también que la sociedad aproveche todas las ventajas de la investigación hecha en combatir la COVID-19 para anticiparse a otras posibles pandemias y disponer así de herramientas para la contención futura siguiendo los principios del concepto One-Health.

#### Bibliografía

1. N. Ribeiro, G.C. Soares, V. Santos-Rosales, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González. A.L. Oliveira, A new era for sterilization based on supercritical CO, technology, J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 108 (2020) 399-428. doi:10.1002/jbm.b.34398.

- L. Garcia-Gonzalez, A.H. Geeraerd, S. Spilimbergo, K. Elst, L. Van Ginneken, J. Debevere, J.F. Van Impe, F. Devlieghere, High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future, Int. J. Food Microbiol. 117 (2007) 1–28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018.
- L. Rao, X. Bi, F. Zhao, J. Wu, X. Hu, X. Liao, Effect of High-pressure CO<sub>2</sub> Processing on Bacterial Spores, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 56 (2016) 1808–1825. doi:1 0.1080/10408398.2013.787385.
- D. Bennet, A.F. Harris, J. Lacombe, C. Brooks, N. Bionda, A.D. Strickland, T. Eisenhut, F. Zenhausern, Evaluation of supercritical CO2 sterilization efficacy for sanitizing personal protective equipment from the coronavirus SARS-CoV-2, Sci. Total Environ. 780 (2021) 146519. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146519.
- L. Calvo, E. Torres, Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO2, J. Supercrit. Fluids. 52 (2010) 134–141. doi:10.1016/j.supflu.2009.11.002.
- J.L. Ellis, J.C. Titone, D.L. Tomasko, N. Annabi, F. Dehghani, Supercritical CO2 sterilization of ultra-high molecular weight polyethylene, J. Supercrit. Fluids. 52 (2010) 235–240. doi:10.1016/j.supflu.2010.01.002.
- A. Bernhardt, M. Wehrl, B. Paul, T. Hochmuth, M. Schumacher, K. Schütz, M. Gelinsky, Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature, PLoS One. (2015) 1–19. doi:10.1371/journal. pone.0129205.
- C. Yavuz, S.N.B. Oliaei, B. Cetin, O. Yesil-celiktas, Sterilization of PMMA microfluidic chips by various techniques and investigation of material characteristics, J. Supercrit. Fluids. 107 (2016) 114– 121. doi:10.1016/j.supflu.2015.08.019.
- J. Shaw, L. Au, B. Hull, S. Hunter, Supercritical Carbon Dioxide Sterilization Minimally Affects Human Allograft Skin Morphology and Biomechanics, in: ASME 2010 Summer Bioeng. Conf., 2010: pp. 1–2.
- Y. Sun, V. Lovric, T. Wang, R.A. Oliver, W.R. Walsh, Effects of SCCO2, Gamma Irradiation, and Sodium Dodecyl Sulfate Treatments on the Initial

- Properties of Tendon Allografts, Mol. Sci. 21 (2020) 1–20.
- N. Russell, R.A. Oliver, W.R. Walsh, The effect of sterilization methods on the osteoconductivity of allograft bone in a critical-sized bilateral tibial defect model in rabbits, Biomaterials. 34 (2013) 8185–8194. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.022.
- N. Russell, A. Rives, M.H. Pelletier, T. Wang, W.R. Walsh, The effect of supercritical carbon dioxide sterilization on the anisotropy of bovine cortical bone, Cell Tissue Bank. 16 (2015) 109–121. doi:10.1007/s10561-014-9447-8.
- S.S. Karajanagi, R. Yoganathan, R. Mammucari, H. Park, J. Cox, S.M. Zeitels, R. Langer, N.R. Foster, Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials, Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 1716–1725. doi:10.1002/bit.23105.
- G. Bertoloni, A. Bertucco, M. Rassu, K. Vezzù, Medical device disinfection by dense carbon dioxide, J. Hosp. Infect. 77 (2011) 42–46. doi:10.1016/j. jhin.2010.09.020.
- C. Cinquemani, C. Boyle, E. Bach, E. Schollmeyer, Inactivation of microbes using compressed carbon dioxide—An environmentally sound disinfection process for medical fabrics, J. Supercrit. Fluids. 42 (2007) 392–397. doi:10.1016/j.supflu.2006.11.001.
- A. Schmidt, K. Beermann, E. Bach, E. Schollmeyer, Disinfection of textile materials contaminated with E. coli in liquid carbon dioxide, J. Clean. Prod. 13 (2005) 881–885. doi:10.1016/j.jclepro.2004.03.003.
- D. Aslanidou, I. Karapanagiotis, C. Panayiotou, Tuneable textile cleaning and disinfection process based on supercritical CO<sub>2</sub> and Pickering emulsions, J. Supercrit. Fluids. 118 (2016) 128–139. doi:10.1016/j.supflu.2016.07.011.
- S. Hossain, N. Norulaini, N. Ab, V. Balakrishnan, A.F.M. Alkarkhi, Z. Ahmad, M. Omar, A. Kadir, Optimizing supercritical carbon dioxide in the inactivation of bacteria in clinical solid waste by using response surface methodology, Waste Manag. 38 (2015) 462–473. doi:10.1016/j.wasman.2015.01.003.
- 19. V. Santos-Rosales, B. Magariños, R. Starbird, J. Suárez-González, J.B. Fariña, C. Alvarez-Lorenzo,

- C.A. García-González, Supercritical CO, technology for one-pot foaming and sterilization of polymeric scaffolds for bone regeneration, Int. J. Pharm. 605 (2021). doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120801.
- 20. C.S.A. Bento, S. Alarico, N. Empadinhas, H.C. de Sousa, M.E.M. Braga, Sequential scCO, drying and sterilisation of alginate-gelatine aerogels for biomedical applications, J. Supercrit. Fluids. 184 (2022) 105570. doi:10.1016/j.supflu.2022.105570.
- 21. R.J.J. de Wit, D.J. van Dis, M.E. Bertrand, D. Tiemessen, S. Siddiqi, E. Oosterwijk, A.F.T.M. Verhagen, Scaffold-based tissue engineering: Supercritical carbon dioxide as an alternative method for decellularization and sterilization of dense materials, Acta Biomater. (2022). doi:10.1016/j.actbio.2022.11.028.
- 22. J. Fages, E. Jean, P. Frayssinet, D. Mathon, B. Poirier, A. Autefage, D. Larzul, Bone allografts and supercritical processing: effects on osteointegration and viral safety, J. Supercrit. Fluids. 13 (1998) 351-356. doi:10.1016/S0896-8446(98)00071-0.
- 23. J. Fages, B. Poirier, Y. Barbier, P. Frayssinet, M.-L. Joffret, W. Majewski, G. Bonel, D. Larzul, Viral Inactivation of Human Bone Tissue Using Supercritical Fluid Extraction, ASAIO J. 44 (1998) 289-293.
- 24. T. Burnour, M. Burnouf, A. Bouzidi, M. Perrut, Method for the viral inactivation of plasmatic products by using supercritical or subcritical fluids, WO94/03590, 1994.
- 25. C.M. Chen, L. Tsai, Y.H. Chiu, Inactivation of virus activity from biological material, in: M. Goto, T. Adschiri, B. Han, Y.-W. Lee (Eds.), 8th Int. Symp. Supercritcical Fluids, 2006: pp. PB2--51.
- 26. Q.-Q. Qiu, P. Leamy, J. Brittingham, J. Pomerleau, N. Kabaria, J. Connor, Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant, J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 91B (2009) 572-578. doi:10.1002/jbm.b.31431.
- 27. A. Bernhardt, M. Wehrl, B. Paul, T. Hochmuth, M. Schumacher, K. Schütz, Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature, PLoS One. 10 (2015) 129205. doi:10.1371/journal.pone.0129205.

- 28. A. Cario, G. Aubert, J.P. Alcaraz, J.P. Borra, N. Jidenko, M. Barrault, S. Bourrous, V. Mocho, F.X. Ouf, S. Marre, P. Cinquin, C. Aymonier, Supercritical carbon dioxide-based cleaning and sterilization treatments for the reuse of filtering facepiece respirators FFP2 in the context of COVID-19 pandemic, J. Supercrit. Fluids. 180 (2022) 105428. doi:10.1016/j.supflu.2021.105428.
- 29. V. Santos-Rosales, C. López-Iglesias, A. Sampedro-Viana, C. Alvarez-Lorenzo, S. Ghazanfari, B. Magariños, C.A. García-González, Supercritical CO<sub>3</sub> sterilization: An effective treatment to reprocess FFP3 face masks and to reduce waste during COVID-19 pandemic, Sci. Total Environ. 826 (2022)
- 30. D. Martín-Muñoz, D.F. Tirado, L. Calvo, Inactivation of Legionella in aqueous media by high-pressure carbon dioxide, J. Supercrit. Fluids. 180 (2022) 105431. doi:10.1016/j.supflu.2021.105431.
- 31. A. Dacal-Gutiérrez, D.F. Tirado, L. Calvo, Inactivation of Clostridium Spores in Honey with Supercritical CO<sub>2</sub> and in Combination with Essential Oils, Processes. 10 (2022) 2232. doi:10.3390/ pr10112232.
- 32. J. Casas, J. Tello, F. Gatto, L. Calvo, Microbial inactivation of paprika using oregano essential oil combined with high-pressure CO<sub>2</sub>, J. Supercrit. Fluids. 116 (2016) 57-61. doi:10.1016/j.supflu.2016.04.012.
- 33. L. Calvo, J. Casas, Sterilization of Biological Weapons in Technical Clothing and Sensitive Material by High-Pressure CO, and Water, Ind. Eng. Chem. Res. 57 (2018) 4680-4687. doi:10.1021/acs. iecr.7b04794.
- 34. L. Calvo, N. Martínez, D.R. Serrano, Inactivation of Staphylococcus epidermidis in personalized implants using high-pressure CO<sub>2</sub>, in: 20 Encuentro Ibérico Fluidos Supercríticos, Coimbra, Portugal, 2022: p. Poster Communication.
- 35. O.A. Salman, Supercritical CO<sub>2</sub> Sterilization: Requirements for Process Qualification, in: 16th Eur. Meet. Supercrit. Fluids, Lisbon, Portugal, 2017: p. Keynote.

# La utilidad de las matemáticas en tiempos de pandemia



Benjamin Pierre Paul **Ivorra** 

ivorra@ucm.es

Grupo de Investigación MOMAT, Instituto de Matemática Interdisciplinar (UCM)



Alicja Barbara Kubik

akubik@ucm.es

Grupo de Investigación MOMAT, Instituto de Matemática Interdisciplinar (UCM)



**Angel Manuel Ramos** del Olmo

angel@mat.ucm.es

Grupo de Investigación MOMAT, Instituto de Matemática Interdisciplinar (UCM)

as matemáticas se componen de una gama amplia de áreas de conocimiento que permiten desarrollar herramientas de apoyo para otros campos, tanto científicos como sociales. Su alta capacidad interdisciplinar es de particular relevancia en el momento de la toma de decisiones, ya sea por ejemplo para el asesoramiento económico, la gestión de desastres o, en este caso, la gestión de epidemias. La epidemiología matemática ha concebido un alto desarrollo durante el último siglo tras la proposición de los modelos conocidos como compartimentales.

## La epidemiología matemática tiene más de 300 años

Históricamente, se considera que uno de los primeros trabajos fundamentales de epidemiología matemática vino de mano del matemático, estadístico, físico y médico Daniel Bernoulli (1700-1782, Suiza) y sus estudios acerca de la viruela y los beneficios a largo plazo del proceso de inoculación [1]. No obstante, no fue hasta principios del siglo XX cuando se introdujeron los hoy propiamente conocidos como modelos compartimentales. Su nombre proviene de la consideración de diferentes «compartimentos» en la población que se está estudiando. Cada uno de estos compartimentos atiende a un estado de salud con respecto a la enfermedad: por ejemplo, el estado susceptible (libre de enfermedad y no inmune) o el estado infeccioso.

Los precursores de estos modelos fueron Sir Ronald Ross y Anderson G. McKendrick [2]. Los modelos compartimentales hacen referencia a aquellos que se basan en la llamada ley de masa y acción, original del campo de la Química. En epidemiología, esta ley establece que las infecciones dependen de las proporciones de individuos infecciosos y susceptibles (entendiéndose «individuos» como un término general que puede referirse a humanos, animales de granja, vectores tales como mosquitos, etc.).

A modo de ejemplo, uno de los modelos estándar de este tipo es el llamado SIRS, que debe su nombre al acrónimo de los compartimentos en los que se divide a la población: Susceptibles, Infecciosos y Recuperados (inmunes a la enfermedad). La última S vuelve a hacer referencia a los Susceptibles, indicando que los individuos recuperados perderán su inmunidad pasado un tiempo y podrán volver a infectarse. En la

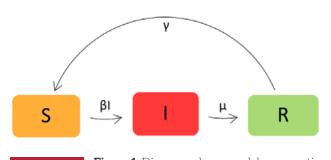


Figura 1. Diagrama de un modelo compartimental SIRS clásico.

Figura 1, se muestra un diagrama de Forrester asociado a este modelo, donde \( \beta \) es la tasa de transmisión de la enfermedad (el número promedio diario de contactos efectivos para transmitir la enfermedad que tiene un individuo infeccioso), y es la tasa con la que se recuperan los individuos infecciosos  $(1/y \text{ es el tiempo que permanecen infectados}) y \mu \text{ es}$ la tasa con la que los individuos recuperados pierden su inmunidad (1/µ es el tiempo que permanecen inmunes).

Estos modelos tienen asociados los conocidos como números de reproducción. En concreto, el número básico de reproducción, comúnmente denotado por R<sub>o</sub>, se refiere al número esperado de infecciones secundarias que generaría un solo individuo infeccioso durante el transcurso de su infección dentro de una población completamente susceptible, al comienzo de la epidemia. Asimismo, otro número de interés es el número efectivo de reproducción, comúnmente denominado por  $R_a$  o  $R_t$ , que hace referencia al número esperado de infecciones secundarias que provocaría un individuo infeccioso durante el transcurso de su infección dentro de una población parcialmente susceptible: esto es, con gente que ya se haya infectado, que sea inmune o, incluso, que la transmisión sea menor que al comienzo de la epidemia debido a la imposición de diversas medidas de control. En el caso del modelo SIRS se puede estimar que  $R_0 = \beta/\gamma$ , es decir, la tasa de transmisión por el tiempo que permanece infeccioso un individuo. El resultado más relevante en base a estos números de reproducción es que, si el número R es mayor que 1, significa que la enfermedad se está expandiendo; si R<sub>2</sub> es menor que 1, la enfermedad está remitiendo.

Estos modelos se pueden complicar dependiendo de la enfermedad que se esté tratando, pues los compartimentos considerados atienden a las características de dicha enfermedad y a las necesidades del estudio a realizar: por ejemplo, muchas enfermedades tienen asociado un período de latencia en el cual uno ya está infectado, pero todavía no puede infectar a los demás, o quizá sea interesante considerar un compartimento de personas hospitalizadas en aras a hacer una previsión de las camas que serán necesarias para evitar una saturación en los hospitales. En cualquier caso, no existe un único modelo para cada enfermedad y, tal y como se menciona, dependerá del estudio que se quiera realizar sobre esta.

## La epidemiología matemática no son solo números

Debido al carácter interdisciplinar de la epidemiología matemática, el trabajo debe ir más allá de las propias matemáticas para poder enfrentar de manera útil el problema. El hecho de trabajar con enfermedades reales, que se pueden estar desarrollando en el mismo momento de la investigación, conlleva necesitar un buen conocimiento de la enfermedad a tratar, en aras a proponer un modelo apropiado. Es importante establecer un adecuado equilibrio entre la realidad biológica y la tratabilidad del modelo propuesto. Entre las tareas a llevar a cabo, se encuentran:

- Recabar información acerca de la enfermedad que se va a estudiar: cada enfermedad tiene características específicas que pueden ser relevantes para el modelo y diferentes de otras enfermedades ya estudiadas. Por ejemplo, una de las problemáticas iniciales de la pandemia por COVID-19 fue la alta cantidad de casos asintomáticos. En el caso del ébola, los cuerpos de las personas fallecidas por esta enfermedad pueden seguir trasmitiendo la enfermedad durante un tiempo.
- Conseguir bases de datos reales que tengan la información relevante sobre la evolución de la pandemia y, en caso de ser necesario, limpiar dichos datos: es necesario disponer de datos con los que calibrar los parámetros del modelo considerado.
- Formular un modelo matemático: esto se realiza en base a la información encontrada, a los datos disponibles, a las necesidades sociales y, por supuesto, al límite de complejidad matemática con el que es viable trabajar. Existen una serie de herramientas matemáticas clásicas para estudiar teóricamente estos modelos y sacar conclusiones cualitativas (por ejemplo, si la enfermedad puede ser endémica); no obstante, si se propone un modelo muy complejo, estas herramientas dejan de ser aplicables.
- Obtener resultados cuantitativos y cualitativos de interés: los modelos matemáticos no son clarividentes, pero sí pueden ofrecer intuición sobre la tendencia que tendrá una enfermedad, pudiendo esta depender de diferentes medidas sociales y políticas que se apliquen para conte-

nerla. Estas estimaciones permiten, entre otros, asesorar sobre las decisiones de dichas medidas.

## Se trabaja para afrontar enfermedades infecciosas

El Grupo de Investigación MOMAT (MOdelos MATemáticos en Ciencia y Tecnología: Desarrollo, Análisis, Simulación Numérica y Control, https:// www.ucm.es/momat/) en colaboración con el Grupo de Investigación SUAT de VISAVET (Centro de VIgilancia SAnitaria VETerinaria, https://www. visavet.es/), ambos de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), empezaron a trabajar juntos sobre modelos de enfermedades infecciosas en 2008. En concreto, presentaron públicamente un primer trabajo durante el 20° Congreso Internacional de la Pig Veterinary Society, mostrando resultados sobre el posible impacto de un brote de fiebre porcina clásica en España [3]. A raíz de esta colaboración, ambos grupos continuaron investigando esta línea, derivando en numerosas publicaciones relativas a diferentes enfermedades animales: fiebre aftosa, lengua azul y fiebre porcina africana [4-7]. Estos trabajos se desarrollaron en el marco de diversos proyectos de investigación financiados por entidades públicas nacionales, europeas e internacionales. Desde 2008, el grupo ha publicado numerosos trabajos basándose en los modelos compartimentales anteriormente introducidos. En particular, es destacable el desarrollo del modelo estocástico Be-FAST (Between-Farms Animal Spatial Transmission), cuyo software está (https://www.sanidadanimal.info/ registrado es/345-be-fast-between-farm-animal-spatialtransmission). Actualmente, el grupo MOMAT es uno de los miembros del proyecto EUROPE VAC-DIVA (https://vacdiva.eu/), cuyo principal objetivo es resolver el problema de la peste porcina africana en Europa y los países afectados, mediante el desarrollo de vacunas para cerdos domésticos y jabalíes.

Basándose en su experiencia en epidemiología veterinaria, el grupo MOMAT comenzó sus investigaciones sobre enfermedades infecciosas humanas. En particular, en 2014 comenzaron a estudiar la propagación del virus del ébola con motivo del brote sucedido ese mismo año [8]. Para ello, implementaron otro modelo compartimental (en este caso, determinístico), el Be-CoDiS (Between-Countries Disease Spread), obteniendo resultados notorios que se hicieron eco por diversos medios perio-

dísticos, tanto nacionales como internacionales (https://www.ucm.es/momat/ebola). Relativos a esta epidemia, se publicaron un buen número de trabajos (incluyendo artículos e informes técnicos), a los que siguieron varios más sobre el brote de ébola de 2018 en la República Democrática del Congo [9].

Finalmente, en 2020, el grupo comenzó a trabajar en el estudio de la pandemia por COVID-19 desde los inicios de la expansión de esta enfermedad. Dada la situación de emergencia internacional, era imperativo trabajar con celeridad en aras a aportar algo de luz a la situación que se estaba viviendo. De ello, surgieron, por un lado, un proyecto interdisciplinar junto con veterinarios para estudiar los efectos de la COVID-19 en diversos animales y, por otro, la participación en un comité de expertos matemáticos nacionales para estudiar la situación de España basada en datos en tiempo real y ayudar tanto al Gobierno Central como a los gobiernos autonómicos en la gestión de la pandemia. Esta línea de investigación ha derivado en varias publicaciones e informes técnicos desde 2020 (véanse, por ejemplo, las publicaciones [10,11] y el informe [12] centrado en España.

Debido a su experiencia previa en el estudio de la COVID-19, el grupo se incorporó al proyecto ANTICIPA-REACT (https://www.ucm.es/ANTI-CIPA-UCM). Se trata de un ambicioso proyecto que desarrolla herramientas para luchar contra la pandemia de COVID-19 y otras posibles pandemias, epidemias o brotes que puedan surgir. Está financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y en él participan, de forma interdisciplinar, un buen número de grupos de investigación de la UCM de diversas áreas. El trabajo del Grupo MOMAT se centra en el tratamiento de datos de pruebas de laboratorios para estudiar la evolución de la incidencia de la COVID-19 en la población y en el desarrollo de programas de vigilancia y de alerta [13].

Un registro más detallado de los trabajos realizados por el Grupo MOMAT en epidemiología se puede encontrar en <a href="https://www.ucm.es/momat/epidemics">https://www.ucm.es/momat/epidemics</a>. Entre los resultados más relevantes del grupo, destacan los relacionados con epidemiología veterinaria, ébola y recientemente COVID-19.

En paralelo a estos trabajos, el Grupo MOMAT, dentro del marco de contratos con empresas sanitarias, ha realizado estudios para analizar los resultados de experimentos in vitro sobre la eficiencia de algunas vacunas.

# Be-FAST: control de epidemias en granjas

En el contexto veterinario, se ha trabajado sobre enfermedades con grandes consecuencias sanitarias y socioeconómicas como la fiebre aftosa (FA), la peste porcina clásica (PPC) o la peste porcina africana (PPA). Los estudios realizados se centran en la creación de un modelo, llamado Be-FAST (Between-Farms Animal Spatial Transmission), para estudiar el riesgo de difusión y el posible control de una epidemia de PPC entre las granjas de porcinos de la provincia de Segovia [4,5]. Este caso concreto fue de gran interés sanitario y económico para el gobierno español (segundo país productor de cerdos de Europa), dada la importancia económica de este sector en esta provincia y el hecho de que Segovia fue afectada en 1997-98 por la PPC. El modelo fue desarrollado considerando una base de datos (con informaciones reales sobre granjas, redes de contacto y epidemias anteriores) proporcionada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Las principales novedades a nivel de modelización respecto a trabajos anteriores fueron las siguientes: la consideración de la difusión de la PPC (tanto a nivel intra-granja como entre granjas), el

uso de una base de datos para crear movimientos entre granjas realistas y la calibración del modelo al contexto español.

Una vez obtenida una primera implementación del modelo, se validó la metodología considerando experimentos numéricos y comparando los resultados obtenidos por el modelo con los producidos por el programa comercial InterSpread Plus y resultados de otras epidemias de PPC en Europa encontrados en la literatura. Los resultados obtenidos con Be-FAST han sido los más acertados considerando datos reales de epidemias de PPC. A continuación, este modelo fue adaptado al estudio de la PPC en Bulgaria [6] y de la FA en Perú [7] para estimar el mapa de riesgo de difusión de estas enfermedades en estos países. Este último trabajo sobre la FA en Perú sirvió de referencia a la Entidad Estatal de Seguros Agrarios (http:// www.mapama.gob.es/es/enesa/) para calcular seguros para agricultores peruanos. En la Figura 2, se presentan algunos de los mapas de riesgo obtenidos con Be-FAST.

Más adelante, se incorporó al modelo un módulo económico que permite estimar el impacto económico de una epidemia, tanto a nivel de pérdidas de producción por parte de las granjas (por ejemplo: sacrificio de animales, devaluación del precio de la carne, ...) como a nivel sanitario por parte de las autoridades (por ejemplo: medidas de control, pago de indemnizaciones, ...). Este módulo es de alto interés ya que permite estudiar

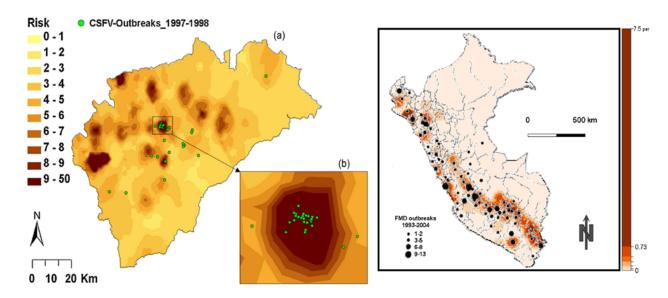


Figura 2. Algunos mapas de riesgo generados con Be-FAST y datos de brotes reales. A la izquierda el caso de Segovia para la PPC, a la derecha el caso de Perú para la FA.

problemas de control de epidemias considerando restricciones económicas.

# Be-CoDiS: predicción de propagación epidemias como el ébola

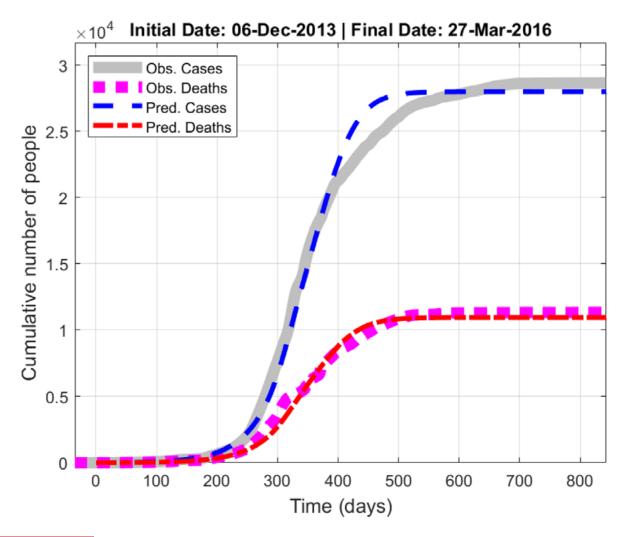
Si se pone el foco en enfermedades humanas, primero se desarrolló, basado en la experiencia en Be-FAST, el modelo Be-CoDiS (*Between-Countries Disease Spread*), para simular y predecir la difusión de epidemias humanas entre países teniendo en cuenta los flujos migratorios [8]. Este modelo fue validado considerando datos de la epidemia de ébola del 2014-16, para la que se generaron algunas predicciones.

Los informes previos sobre este trabajo (https://arxiv.org/abs/1410.6153) tuvieron un gran eco en la prensa (https://www.ucm.es/momat/ebola), incluyendo noticias que hablaban de este modelo y confirmaban las predicciones realizadas. En la Figura 3 se presenta la evolución a nivel mundial del número de casos

y fallecidos durante el brote de ébola de 2014-16 en comparación a la simulación con Be-CoDiS.

La versión actual del software Be-CoDiS se encuentra disponible de forma gratuita en la página web del grupo de investigación (<a href="http://www.mat.ucm.es/momat/software.htm">http://www.mat.ucm.es/momat/software.htm</a>). Esta versión incorpora todos los datos utilizados en las simulaciones realizadas para la epidemia de ébola.

A continuación, se realiza un análisis de sensibilidad del modelo, en particular para resaltar los parámetros que tienen mayor impacto en la difusión de la enfermedad. En base al estudio anterior [8], en [9] se propuso una metodología para diseñar estrategias adecuadas para contener la magnitud de brotes de ébola (por ejemplo: casos, muertes, duración, ...) considerando una amplia gama de posibles medidas de control: vacunas, campañas de información, tratamientos en hospitales, campañas de detección precoz y cuarentenas.



**Figura 3.** Evolución a nivel mundial del número de casos y de fallecidos durante el brote de ébola de 2014-16 en comparación a la simulación con Be-CoDiS.

# Aplicando las matemáticas en el estudio de la pandemia de COVID-19

El grupo ha publicado una serie de tres artículos que siguen la evolución de la pandemia por COVID-19 desde febrero de 2020 hasta agosto de 2021 y ha participado, junto con otros grupos de investigación, en la publicación de otro artículo sobre el impacto de la pandemia en perros y gatos en España. El primero de los tres mencionados proponía un modelo específico para el caso de China al inicio de la pandemia [11]; fue la primera aproximación del grupo para entender las dinámicas de la patología y una de las precursoras del estudio matemático de esta enfermedad. En concreto, el modelo propuesto se basaba en el anterior modelo Be-CoDiS, teniendo también en cuenta el efecto de la gente no detectada en la propagación de la enfermedad, diferentes niveles de infección para la gente hospitalizada, la imposición de diferentes medidas de control y la necesidad de estimar la cantidad de camas requerida para poder enfrentarse a la saturación hospitalaria. Concretamente, se trata de un modelo denominado θ-SEIHRD, siendo: θ el parámetro que modela la proporción de gente infectada pero no detectada, S el compartimento de personas susceptibles a infectarse, E el compartimento de expuestos (gente infectada en período de incubación, con un menor nivel de infecciosidad), I el compartimento de infecciosos, con un subcompartimento I para los no detectados (undetected), H los hospitalizados, R los recuperados y D los fallecidos. En este trabajo se demostró la importancia de la gente no detectada en la difusión de la enfermedad y la necesidad de incrementar las pruebas de detección para reducir el impacto de la pandemia. Este modelo fue también capaz de revelar algunas anomalías en el reporte oficial de los fallecidos (estaban subestimados).

Posteriormente, con la expansión de la enfermedad por Europa, se preparó una segunda versión del modelo para estudiar la dinámica de la epidemia en Italia [14], teniendo en cuenta que la cuarentena se aplicaba para los individuos infecciosos que habían sido detectados y tenían síntomas leves. La elección de Italia se debía a dos motivos: (1) fue el país donde se detectó el primer caso de una persona positiva en Europa y (2) desde un momento muy temprano contaron con bases de datos muy completas y coherentes, reportadas y actualizadas de forma pública por el propio Gobierno italiano; tal y como se comentaba anteriormente, esto es muy importante a la hora de trabajar con este tipo de modelos.

Finalmente, en diciembre de 2020, se realizó un tercer trabajo, publicado al año siguiente, considerando el descubrimiento de la variante Alfa del virus y el

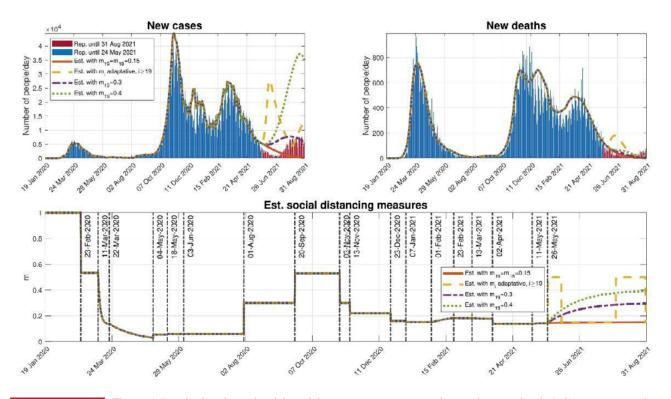


Figura 4. Resultados obtenidos del modelo propuesto, comparando con datos reales de Italia y presentando diferentes escenarios a futuro.

inicio de las primeras campañas de vacunación en Europa [15]. Este trabajo también se llevó a cabo con los datos de Italia. En la Figura 4 se muestran algunos resultados de este trabajo. En concreto, se presenta la comparación entre los datos reales de casos de infección y muertes y la calibración del modelo propuesto, así como una serie de posibles escenarios a futuro dependiendo de las medidas sociales de control implementadas. Asimismo, se presenta la evolución de las medidas de control y cuatro propuestas diferentes para el futuro: mantener las medidas (rojo), adaptarlas a la incidencia acumulada de los últimos 14 días (amarillo) o relajarlas (morado y verde).

En esta figura se puede observar que los datos reales están dados en dos colores diferentes: en azul, se reportan los datos históricos que se utilizaron para calibrar los parámetros del modelo, y en rojo, una actualización realizada en julio de 2022 con motivo de comparar la realidad con los escenarios propuestos [16].

De este artículo se derivaron dos conclusiones importantes:

- En ese momento, las tasas de vacunación no eran suficientes para evitar una nueva ola si las medidas de control se relajaban demasiado rápido.
- En un inicio, se propusieron tres números efectivos de reproducción diferentes: uno global (R<sub>s</sub>), otro relativo a la variante original (R<sub>2</sub>(1)) y otro para la variante Alfa (R<sub>2</sub>(2)). Esto llevó a intuir que no era suficiente con que Re fuera menor que 1 para afirmar que la enfermedad estaba controlada y que era probable que ocurriera una tercera ola en Italia debido a que el número efectivo de reproducción de la variante Alfa era mayor que 1. Es decir, la nueva variante iba ganando terreno silenciosamente y podía imponerse llevando a una tercera ola, lo cual finalmente sucedió. Se puede observar claramente la dominancia de la variante Alfa en la Figura 5, donde se muestra el escenario con las medidas de control adaptativas.

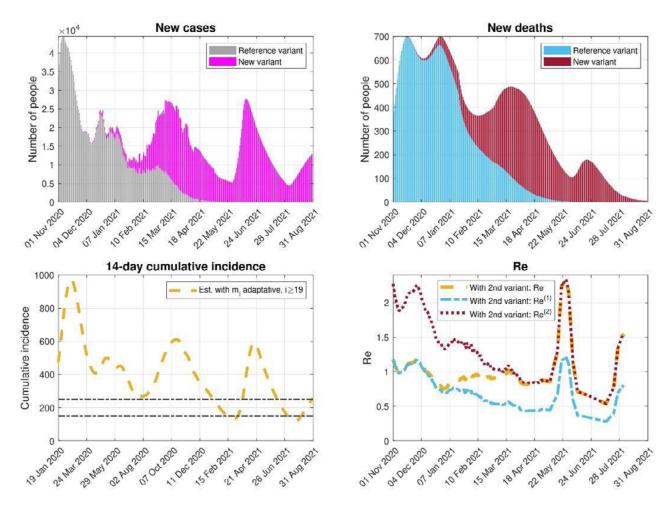


Figura 5. Resultados obtenidos del modelo presentando un escenario a futuro dependiente de medidas de control adaptativas.

Finalmente, cabe destacar que el grupo MOMAT, dentro del marco del proyecto ANTICIPA-REACT, participa en el desarrollo de la aplicación informática COVID-LOT, que sirve de herramienta de digitalización, almacenamiento y procesamiento de datos y trazabilidad de los protocolos analíticos utilizados en la red de laboratorios. Además, se están desarrollando modelos para poder lanzar alertas en caso de detectar un incremento relevante en la incidencia de la epidemia de COVID-19 en base a los datos recibidos [13].

# Las matemáticas ayudan a tomar decisiones

Como se ha visto a lo largo de los numerosos ejemplos anteriores, las matemáticas tienen un gran potencial como herramienta para el estudio de problemas reales, concretamente para la toma de decisiones en caso de brotes, epidemias y pandemias. En particular, los modelos compartimentales, cuando estén apoyados por datos de suficiente calidad, son especialmente útiles debido a su gran adaptabilidad y su relación directa con los procesos biológicos de la enfermedad.

Gracias a los trabajos desarrollados, el Grupo MO-MAT ha desarrollado altas competencias en esta temática, aportando contribuciones de interés para la comunidad científica e integrándose en proyectos interdisciplinares (involucrando grupos de áreas científicas distintas, como veterinaria y medicina).

\*Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Gobierno de España bajo el proyecto PID2019-106337GB-I00 y el Grupo de Investigación MOMAT (Ref. 910480) financiado por la Universidad Complutense de Madrid. La segunda autora está asimismo financiada por una ayuda predoctoral FPU del Ministerio de Universidades del Gobierno de España.

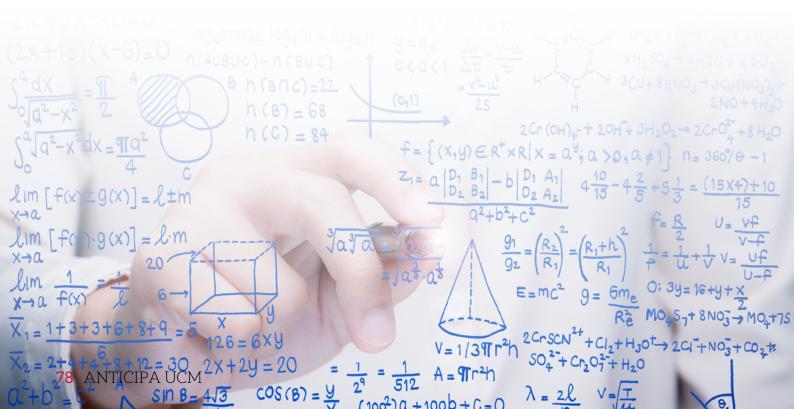
## Bibliografía

- 1. D. Bernoulli. Essai d'une nouvelle analyse de la mortalité causée par la petite vérole et des avantages de l'inoculation pour la prévenir. Mémoires de mathématiques et de physique, Académie royale des sciences, 1-45 (1760).
- 2. H. Heesterbeek. The law of mass-action in epidemiology: A historical perspective. Ecological

- Paradigms Lost, 81-105 (2005). DOI: https://doi. org/10.1016/B978-012088459-9/50007-8.
- 3. B. Martínez-López, B. Ivorra, Á. M. Ramos & J. M. Sánchez-Vizcaíno. Modelling the spread of classical swine fever into Spain using a spatial and stochastic model. En actas de The 20th International Pig Veterinary Society Congress, pág. 87, Durban, Sudáfrica (22-26 junio 2008).
- 4. B. Martínez-López, B. Ivorra, A. M. Ramos & J. M. Sánchez-Vizcaíno. A novel spatial and stochastic model to evaluate the within and between farm transmission of classical swine fever virus: I. General concepts and description of the model. Veterinary Microbiology, 147(3-4): 300-309 (2011). DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.009.
- 5. B. Martínez-López, B. Ivorra, D. Ngom, Á. M. Ramos & J. M. Sánchez-Vizcaíno. A novel spatial and stochastic model to evaluate the within and between farm transmission of classical swine fever virus: II Validation of the model. Veterinary Microbiology. 155(1): 21-32 (2012). DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.008.
- 6. B. Martínez-López, B. Ivorra, Á. M. Ramos, E. Fernández, T. Alexandrov & J. M. Sánchez-Vizcaíno. Evaluation of the risk of Classical Swine Fever (CSF) spread from backyard pigs to other domestic pigs by using the spatial stochastic disease spread model Be-FAST: the example of Bulgaria. Veterinary Microbiology, 165: 79-85 (2013). DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.045.
- 7. B. Martínez-López, B. Ivorra, E. Fernández-Carrión, A.M. Pérez, A. Medel-Herrero, F. Sánchez-Vizcaíno, C. Gortázar, Á.M. Ramos & J.M. Sánchez-Vizcaíno. A multi-analysis approach for space-time and economic evaluation of risks related with livestock diseases: The example of FMD in Peru. Preventive Veterinary Medicine, 114: 47-63 (2014). DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.013.
- 8. B. Ivorra, D. Ngom & A. M. Ramos, Be-CoDiS: A Mathematical Model to Predict the Risk of Human Diseases Spread Between Countries-Validation and Application to the 2014--2015 Ebola

- Virus Disease Epidemic. Bulletin of Mathematical Biology, 77(9): 1668-1704 (2015). DOI: <a href="http://dx.doi.org/10.1007/s11538-015-0100-x">http://dx.doi.org/10.1007/s11538-015-0100-x</a>.
- R. Seck, D. Ngom, B. Ivorra & A. M. Ramos. An optimal control model to design strategies for reducing the spread of the Ebola Virus Disease. Mathematical Biosciences and Engineering, 19(2): 1746 1774 (2022). DOI: https://doi.org/10.3934/mbe.2022082.
- S. Barroso-Arévalo, A. Barneto, A. M. Ramos, B. Rivera, R. Sánchez, L. Sánchez-Morales, M. Pérez-Sancho, A. Buendía, E. Ferreras, J. C. Ortiz-Menéndez, I. Moreno, C. Serres, C. Vela, M. A. Risalde, L. Domínguez & J. M. Sánchez-Vizcaíno. Large-scale study on virological and serological prevalence of SARS-CoV-2 in cats and dogs in Spain. Transboundary and Emerging Diseases, 69(4): 759-774 (2021). DOI: https://doi.org/10.1111/tbed.14366.
- B. Ivorra, M. R. Ferrández, M. Vela-Pérez & A. M. Ramos. Mathematical modeling of the spread of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) taking into account the undetected infections. The case of China. Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation, 88: 105303 (2020). DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2020.105303">https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2020.105303</a>.
- 12. M.R. Ferrández, M. Vela-Pérez, A.B. Kubik, A.M. Ramos & B. Ivorra. La delgada línea entre la 2ª y

- la posible 3ª ola de COVID-19 en España. Informe técnico. ResearchGate (12 diciembre 2020). DOI: https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22467.22560.
- 13. A. Velasco, F. Burillo, B. Ivorra, J.J. Gómez & A.M. Ramos. COMPLUPCR: un sistema de gestión avanzado de muestras en la red de laboratorios COVID-LOT. New Medical Economics Anticipa UCM. Julio 2023.
- 14. A. M. Ramos, M. R. Ferrández, M. Vela-Pérez, A.B. Kubik & B. Ivorra. A simple but complex enough θ-SIR type model to be used with COVID-19 real data. Application to the case of Italy. Physica D: Nonlinear Phenomena, 421: 132839 (2021). DOI: https://doi.org/10.1016/j.physd.2020.132839.
- A.M. Ramos, M. Vela-Pérez, M.R. Ferrández, A.B. Kubik & B. Ivorra. Modeling the impact of SARS-CoV-2 variants and vaccines on the spread of COVID-19. Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation, 102: 105937 (2021). DOI: https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2021.105937.
- 16. A.B. Kubik, M.R. Ferrández, M. Vela-Pérez, B. Ivorra & A.M. Ramos. Modelling the COVID-19 pandemic: Variants and vaccines. En actas de The 8th European Congress on Computational Methods in Applied Sciences and Engineering, ECCOMAS Congress 2022, Oslo, Noruega (5-9 junio 2022). https://doi.org/10.23967/eccomas.2022.184.



# Inactivación de patógenos mediante luz



Javier Alda Serrano javier.alda@ucm.es Grupo Complutense de Óptica Aplicada. Facultad de Óptica y Optometría



Juan Carlos
Martínez-Antón
jcmartin@fis.ucm.es
Grupo Complutense de Óptica
Aplicada. Facultad de Óptica y

Optometría



Fernández-Balbuena antonioa@opt.ucm.es Grupo Complutense de Óptica Aplicada. Facultad de Óptica y

Optometría

Antonio Álvarez



Daniel Vázquez Molini dvazquez@fis.ucm.es Grupo Complutense de Óptica Aplicada. Facultad de Óptica y Optometría

# Óptica y luz: una solución brillante para combatir la pandemia

arzo de 2020 fue un mes que siempre se recordará por lo que se vivió. De repente, el país se detuvo y toda la actividad cotidiana se transformó en excepcional. La pandemia llegaba en oleadas y con perspectivas inciertas en todos los sentidos. Sin embargo, en el ámbito académico, la costumbre arraigada de considerar y apreciar todas las facetas de la realidad apaciguó los ánimos y centró los esfuerzos. El hecho de estar en casa, confinados, dio la oportunidad de pensar con más sosiego. Fue entonces cuando la ciencia se puso en modo de emergencia para participar en el manejo del serio problema que acuciaba a la sociedad. El primer objetivo era encontrar una vacuna que detuviese la proliferación y controlase la pandemia. Pero también en el entorno se sucedían los llamamientos para aportar material de protección, desinfectantes o cualquier otra manera de generar soluciones a los retos expuestos. Mientras tanto, las ideas iban refinándose y el conocimiento se ponía al servicio de la innovación y la creatividad frente al nuevo reto.

Esta contribución describe brevemente un periplo científico y tecnológico para proporcionar herramientas de inactivación de patógenos mediante luz. En este sentido, se considera que todo lo que se ha aprendido sobre el uso de tecnologías ópticas de desinfección, además de ser eficaz para el control del COVID-19,

puede ser inmediatamente adaptado a cualquier otra amenaza de microorganismos. En resumen, la pandemia dio la oportunidad de aplicar el conocimiento que previamente se había ido acumulando para resolver un problema tan serio como la mejora de la salud de las personas. Así pues, se ha vuelto a comprobar que la óptica y las ciencias de la luz son extraordinariamente útiles y, en ocasiones, imprescindibles para mejorar el bienestar de la sociedad.

Tras varias conversaciones telefónicas y teleconferencias entre un grupo cercano de profesionales en el ámbito de la óptica aplicada en varias universidades e instituciones (Universidad Rey Juan Carlos, Centro de Investigación en Sanidad Animal, industrias de iluminación) se comenzó a perfilar un plan de trabajo. La experiencia de décadas en el diseño de luminarias y sistemas de irradiación de luz, combinada con un rápido aprendizaje sobre el uso de la luz para la desinfección de fluidos y superficies, permitió generar y valorar ideas para el uso de radiación ultravioleta (UV) para el tratamiento de entornos de riesgo.

El éxito estaba asegurado por todo el saber previamente adquirido en la puesta en marcha de sistemas de desinfección hospitalaria con lámparas UV y en otros ámbitos [1, 5, 8]. Se sabía de su eficacia para la inactivación de casi cualquier tipo de patógeno: virus, bacterias, hongos, esporas, etc. y lo que quedaba era adaptar todo ese saber a la nueva situación. A la vez, el análisis detallado de la literatura científica permitió identificar

ciertos aspectos que no habían sido completamente resueltos y que, bajo esta perspectiva, requerían una atención específica [1].

Por otro lado, se produjo un aumento vertiginoso de estudios y publicaciones sobre el SARS-CoV-2 que incluían una gran variedad de hallazgos. Las revistas científicas comenzaron a preparar secciones especializadas en todo lo que tuviese que ver con la pandemia. Y en el campo de óptica y fotónica, hubo un florecimiento en el intercambio de ideas con el fin de paliar los efectos del COVID-19. Resultaba muy relevante conocer y tratar el medio de contagio de la enfermedad. El análisis y actividad fue evolucionando junto con el conocimiento que se iba obteniendo sobre las vías de infección y contagio. En un primer momento, ante los primeros brotes conocidos, se hizo hincapié en los fómites. Para la población general se establecieron recomendaciones para manejar objetos que habían pasado por situaciones potencialmente contagiosas. Así, la higiene de manos y el uso de los geles hidroalcohólicos fueron las nuevas rutinas que se aprendieron. El primer objetivo fue la irradiación de superficies para su higienización, desinfección y esterilización. Ciertos ambientes eran más propicios para la aplicación de las técnicas basadas en la luz. Así pues, recintos cerrados como ascensores y medios públicos de transporte iban requiriendo soluciones. También desde el principio, y cada vez con mayor certeza, se fue identificando que la contaminación a través de los aerosoles respiratorios generados por personas infectadas eran el principal vehículo de contagio. Por ello, los objetivos fueron dirigidos al reto de desinfectar el aire de forma eficaz usando radiación luminosa, centrado también en el análisis de gotículas contenedoras de patógenos.

En las siguientes secciones se analizan los aspectos más relevantes del trabajo de estos últimos 3 años. En ellas se muestran las bases fundamentales y los modelos ópticos que han permitido avanzar. Destacando que los resultados que se presentan no hubiesen sido posibles sin un enfoque multidisciplinar y, por otro lado, se ha contado con la generosidad propia del mundo académico para la compartición de la información y con la cooperación imprescindible de empresas e instituciones que además buscan la protección de la propiedad intelectual de sus hallazgos.

## Luz por un tubo

Las lámparas de descarga de vapor de mercurio a baja presión, los tubos fluorescentes, han sido compañeras en todo tipo de instalaciones de iluminación hasta

hace muy poco tiempo cuando han sido sustituidas por fuentes LED (Light Emitting Diode). Su funcionamiento está basado en la emisión de luz en el rango del UV-C (en torno a los 254 nm de longitud de onda) mediante una descarga eléctrica. Para iluminación, esa luz UV se convierte en visible mediante la aplicación de sustancias fluorescentes en el interior de un tubo de vidrio que encierra al gas. De esa manera, se elimina la radiación UV y se genera luz visible. Ahora bien, esa misma radiación se puede utilizar para otro tipo de aplicaciones industriales y biológicas: curado de resinas y efectos germicidas, entre otras. Lo único que es necesario es confinar el gas en un tubo de cuarzo (en vez de vidrio, que es opaco al UV) y eliminar el uso de sustancias fluorescentes. De hecho, este tipo de lámparas resultan muy eficaces desde el punto de vista energético, ya que generan mucha radiación óptica con un consumo moderado. Además de esta característica, la tecnología para la fabricación de este tipo de lámparas ha sido refinada durante décadas dado su uso en tubos fluorescentes. Por tanto, es una fuente de luz UV sencilla de manejar, asequible económicamente y con una gran eficiencia energética.

La radiación emitida por las lámparas de mercurio se haya en una región en donde la interacción con medios biológicos es conocida desde los inicios de la tecnología de estas fuentes. La banda UV-C (con longitudes de onda entre 100 nm y 280 nm) tiene efectos germicidas bien descritos en la literatura [5] y su empleo entraña riesgos para la salud que en muchas ocasiones hace incompatible su uso con la presencia de personas que no porten equipos de protección ocular y cutánea.

En estos trabajos se ha optado por este tipo de fuentes para adaptarlas a diversos diseños de luminarias y de sistemas de desinfección. En el párrafo anterior se han descrito algunas de sus ventajas, pero a la vez, se es consciente de algunos de sus inconvenientes. Por ello, el interés se ha ido trasladando hacia fuentes LED en el UV. El desarrollo de fuentes LED en el visible para iluminación ha supuesto un avance sustancial en el diseño de instalaciones y en la mejora del rendimiento energético. Lamentablemente, las fuentes LED en UV no han sido partícipes de estos avances en la misma medida. Ello ha dado lugar a que los LED UV que se han comercializado hasta la fecha presentan valores de eficacia mucho más bajos que las fuentes de descarga. Sin embargo, la tecnología de fabricación dará lugar en breve a fuentes LED UV más compactas y eficaces. Afortunadamente, el trabajo realizado en el diseño de luminarias UV para lámparas de mercurio puede ser

fácilmente adaptado a estas nuevas fuentes y, de hecho, este grupo ya ha comenzado a probar diseños para su uso en sistemas de desinfección de fluidos gaseosos.

# Dosis y niveles de desinfección

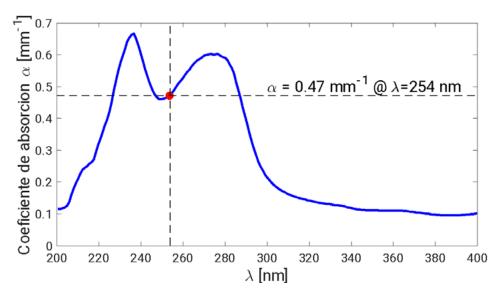
Ya se sabía que la luz emitida en el UV por una lámpara de mercurio era capaz de inactivar casi cualquier tipo de microorganismo. Sin embargo, quedaba la duda de cuánta luz era necesaria para realizar esa misión. La capacidad de daño de la luz UV depende de la cantidad de energía depositada en el medio en el que está el patógeno. Ahora bien, la mayoría de las fuentes de luz están caracterizadas por el valor de la potencia emitida, que es la energía radiante dividida por el tiempo. Por ello, para calcular la energía depositada es necesario considerar la potencia radiante que llega al patógeno y multiplicar ese valor por el tiempo de exposición. Por otro lado, toda esa energía puede estar concentrada en un área muy pequeña o distribuida sobre una superficie mayor. Así pues, las magnitudes de interés en este caso son la irradiancia - es decir, la densidad superficial de potencia radiante -, medida en W/m², y la fluencia densidad superficial de energía radiante -, que se mide en J/m<sup>2</sup>. Por tanto, la dosis estará determinada por el valor de fluencia que llega hasta el plano de interés donde están los patógenos que se desean inactivar. Los modelos de interacción fotoquímica aplicables a virus de ARN (ácido ribonucleico) de cadena sencilla permitían aplicar un modelo relativamente simple que, matemáticamente, se puede expresar de la siguiente manera:

$$N_s = N_0 \exp\left(-rac{F}{F_i}
ight).$$

Ecuación 1. Modelos de interacción fotoquímica aplicables a virus de ARN de cadena sencilla.

Donde N<sub>c</sub> es el número de patógenos supervivientes cuando se comienza la irradiación con un número inicial N<sub>o</sub> y se somete el sistema biológico a una fluencia F. El parámetro clave para la adecuada aplicación de la ecuación 1 es Fi, que es más conocido como fluencia específica. Esta magnitud es esencial para poder determinar el nivel de desinfección. Por ejemplo, un nivel de desinfección del 90% indicará un valor final de N = 0.1N<sub>o</sub>. La presencia de una función exponencial en la ecuación 1 permite mejorar la descripción utilizando el log<sub>10</sub> para expresar estos niveles. De esta manera, un cambio de una unidad logarítmica significa, por ejemplo, un paso de un nivel de desinfección de 99.0% a 99.9%, es decir, se añade un 9 al valor del nivel de inactivación.

El valor de F, depende del tipo de patógeno y de la longitud de onda. En ese sentido, el conocimiento de esta magnitud es esencial para determinar el tiempo de exposición a la luz UV cuando se emplea una cierta lámpara que proporciona un valor de flujo radiante sobre la superficie de interés. Esta determinación requiere un ensayo dedicado, en laboratorios de seguridad biológica certificados, para obtener valores de supervivencia en función de la dosis recibida. En el caso de patógenos



 $\textbf{Figura 1.} \ \text{Coeficiente de absorción}, \ \alpha, \ \text{en función de la longitud de onda}, \ \lambda, \ \text{del medio de cultivo DMEM} \ (\textit{Du-longitud de onda}, \ \lambda)$ belcco's Modified Eagle Medium) en rango del UV. El valor de  $\lambda$  emitido por las lámparas de mercurio a baja presión es de 254 nm y está indicado por la línea vertical. A esta longitud de onda se obtiene un valor de  $\alpha$ =0.47 mm<sup>-1</sup>.

víricos, estos ensayos se realizan con preparaciones que contienen una cantidad conocida de patógenos. Estas preparaciones suelen emplear líquidos en los que habitan los virus. Por tanto, al irradiar con UV la muestra también se está interaccionando con el medio en el que se ha preparado el cultivo. En este caso, se ha considerado que el medio empleado absorbe de forma selectiva y no despreciable, la radiación UV que le llega. Es decir, las medidas estarán afectadas por esta absorción y los virus que permanezcan en regiones más profundas de esta preparación van a estar sometidas a menor nivel de fluencia y, por lo tanto, sobrevivirán más. Mediante técnicas espectroscópicas, es posible medir cuantitativamente el coeficiente de absorción, α, del medio en función de la longitud de onda (Figura 1). A partir de ese coeficiente, mediante un modelo de propagación óptica, es posible conocer cuánta fluencia llega a cada punto de la muestra irradiada calculando la longitud recorrida por la luz dentro del medio, d (x, y, z), pudiendo así evaluarse la supervivencia del patógeno. Bajo esta premisa, la ecuación 1 se convierte en la siguiente:

$$N_s(x,y,z) = N_0(x,y,z) \exp\left(-\frac{F_0 \exp[-\alpha d(x,y,z)]}{F_i}\right)$$

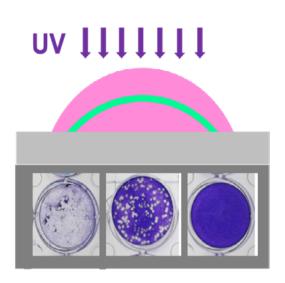
Ecuación 2. Modelos de interacción fotoquímica aplicables a virus de ARN de cadena sencilla considerando el coeficiente de absorción del medio de cultivo o muestra.

Donde se indica de forma explícita que la supervivencia del patógeno depende de la posición (x, y, z) en la que se encuentre dentro del medio cultivo o muestra. El resultado de este procedimiento es la obtención de la fluencia característica, Fi, del patógeno "desnudo", es decir, tras haber eliminado el efecto del medio en el que se encuentra. Este modelo de interacción ha sido posible gracias a la colaboración entre la óptica aplicada y la biología. Los estudios realizados en el Centro de Investigaciones en Sanidad Animal, liderados por el Dr. Alejandro Brun, han permitido verificar estas hipótesis y generar un modelo más robusto para la determinación de la fluencia característica de inactivación cuando se utilizan medios con absorción óptica no despreciable (Figura 2).

El valor obtenido para la fluencia específica del SARS-CoV-2 con este procedimiento ha sido de 4.71 J/m<sup>2</sup> [6]. En la Figura 2 se muestra el ajuste de los datos experimentales con el modelo dado por la ecuación 2. Una vez conocido este parámetro, se pueden establecer los tiempos de exposición a la radiación que produce un determinado valor de densidad de potencia y ligarlos a los niveles de desinfección deseados. En la Tabla 1 se muestran las dosis (en J/m²) necesarias para obtener un determinado valor de desinfección o inactivación.

# Reservorios ópticos y comportamientos asintóticos

La capacidad de inactivación de la luz UV ha sido suficientemente probada y ya forma parte del conocimien-



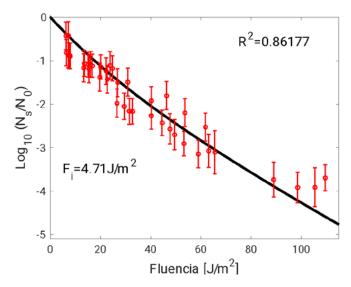


Figura 2. Izquierda: modelo de gota para considerar la absorción del medio de cultivo y resultados de la inactivación del SARS-CoV-2 para tres valores crecientes de fluencia. Derecha: curva de inactivación del SARS-CoV-2 en función de la fluencia recibida por el medio de cultivo. Esta curva responde al modelo dado en la ecuación 2 y proporciona un valor de Fi=4.71 J/m2, con un coeficiente de ajuste igual a 0.86. Los datos experimentales se expresan como círculos rojos a los que se han añadido las barras de error ligadas a las incertidumbres de la medida.

Valor de inactivación [%]	Dosis, Fluencia [J/m2]
50%	3.3
63%	4.7
90%	10.8
99%	21.7
99.9 %	32.5
99.99 %	43.4
99999%	54.2

Tabla 1. Fluencia vs. inactivación.

to básico. Buena parte de los resultados que aparecen en la literatura científica describen una disminución de la supervivencia de los patógenos cuyo ritmo de caída se detiene y genera un comportamiento asintótico [1]. Es decir, a pesar de aumentar la fluencia aplicada, no es posible disminuir el número de patógenos supervivientes con la misma tendencia observada a bajos niveles de fluencia. Este hecho sugiere la existencia de reservorios de patógenos que no son adecuadamente irradiados. Estos modelos han permitido evaluar dos tipos de estos escondites. Por un lado, se ha analizado y evaluado el efecto de la propagación de la luz en gotículas de medio acuoso, con la posibilidad de incluir los efectos de la absorción de la luz [7]. Y, por otro lado, se ha considerado el efecto de la naturaleza ondulatoria de la luz, que proporciona distribuciones de irradiancia con patrones interferenciales. Estos patrones pueden generar regiones oscuras en las proximidades de las paredes o superficies de contacto con el medio en el que está el patógeno. Estos dos efectos pueden explicar el comportamiento de las medidas experimentales de supervivencia en las que se aprecia la presencia

de comportamientos asintóticos. Los resultados de estas simulaciones para evaluar la importancia de estos reservorios se muestran en la Figura 3, donde se ha calculado la distribución de fluencia en el caso de una gotícula (izquierda) y en el caso de una superficie rugosa (derecha).

#### Tecnologías ópticas de inactivación

Además de los resultados de ciencia básica referidos anteriormente, durante estos últimos años, este grupo de investigación ha aportado diversas soluciones para la desinfección e higienización de espacios. A través de contratos y proyectos de investigación con empresas e instituciones se han podido desarrollar las siguientes soluciones:

- Desinfección de cabinas de ascensores.
- Desinfección de suelas de calzado.
- Sistemas de medida de dosis UV.
- Desinfección de locales y espacios mediante plataformas robóticas autónomas.
- Sistemas de desinfección del aire capaces de incluirse en instalaciones de climatización y aire forzado.

Buena parte de estas soluciones han dado lugar a patentes y modelos de utilidad que protegen la propiedad intelectual de los inventores y patrocinadores [2, 3, 4, 9]. En la Figura 4 se muestran dos ejemplos de aplicación. A la izquierda se puede ver una de las luminarias para la irradiación de superficies que se embarca en un robot autónomo y a la derecha se

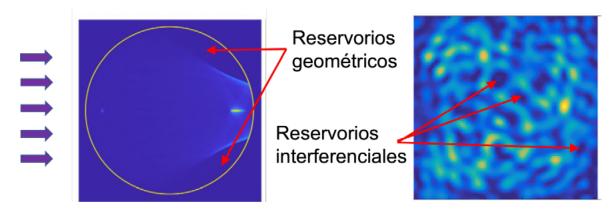


Figura 3. Izquierda: distribución de luz en el interior de una gota de medio acuoso. Debido a las propiedades de propagación de la luz, esta no se reparte de forma homogénea por toda la gota, dejando regiones sin iluminar. Estas regiones constituyen reservorios geométricos en donde no se alcanzan niveles de fluencia capaces de generar la inactivación del patógeno. Derecha: distribución de irradiancia en una región próxima a la superficie cuando se ilumina ésta desde arriba. Las regiones oscuras son reservorios interferenciales.



**Figura 4.** Izquierda: medida y calibración de una luminaria embarcable en un robot autónomo de desinfección de superficies mediante UV. Derecha: interior de un dispositivo óptico para la desinfección de aire. El color azul proviene de parte de la emisión en el visible de la fuente de mercurio a baja presión.

observa el interior de un sistema de desinfección de aire mediante radiación UV.

# Innovaciones en desinfección: avanzando hacia un futuro más seguro

Existen todavía muchos aspectos que han de requerir un mayor seguimiento y atención para mejorar los resultados y la eficacia de las tecnologías desinfectantes. Por ello, se nombran un par de aspectos que se consideran que pueden generar resultados positivos en el futuro. Por un lado, la medida de la inactivación de medios gaseosos está siendo acometida a través de procedimientos novedosos, tanto en el diseño del experimento como en las fuentes de luz empleadas, en las que se incorporaron LED UV. Por otro lado, la aplicación simultánea de agentes físicos (luz UV) y químicos (ozono) puede mejorar la eficacia de estos agentes a dosis compatibles con la presencia humana, respetando los límites seguros para la salud humana y medioambiental. Así pues, los primeros resultados obtenidos en laboratorio combinando estas dos tecnologías han disminuido los límites de exposición para niveles moderados de desinfección, hasta hacerlas compatibles con la presencia de personas.

En esta actividad investigadora y tecnológica se ha podido apreciar cómo los resultados obtenidos de una investigación más básica o fundamental han sido inmediatamente transferidos a soluciones para la mitigación de la pandemia de COVID-19. A la vez, se ha demostrado que una adecuada financiación – pública y privada – sostenida en el tiempo y un constante diálogo interdisciplinar han sido claves para el éxito de estas iniciativas.

#### Bibliografía

 M. Buonanno, D. Welch, I. Shuryak, D. J. Brenner, "Far-UVC light (222 nm) efficitly and safley inactivates airbone human coronaviruses". Scientific Reports.

- 10, 10285. (2020) https://doi.org/10.1038/s41598-020-67211-2.
- A. A. Fernández-Balbuena, D. Vázquez, J. Alda, J.M. López-Alonso, S. Mayorga-Pinilla, A. Cuadrado. "Sistema de radiación UV autónomo para desinfección de superficies", Modelo de utilidad ES1249381 U (2020)
- A. A. Fernández-Balbuena, M. Ibañez, D. Vázquez, J.C. Martínez-Antón, J. Alda, "Dosímetro de radiación UV". Modelo de utilidad ES1254354U (2020)
- 4. M. Ibañez, J. Alda, "Dispositivo de desinfección de objetos", Modelo de utilidad, ES1257380 U
- 5. W. Kowalski, "Ultraviolet germinicidal irradiation handbook". Springer (2020)
- J. C. Martínez-Antón, A. Brun, D. Vázquez, S. Moreno, A. A. Fernández-Balbuena, J. Alda, "Determination of the characteristic inactivation fluence for SARS-CoV-2 under UV-C radiation considering light absorption in curture media", Scientific Reports, 11, 15293 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-94648-w.
- J. Quintana, A. A. Fernández-Balbuena, J.C. Martínez-Antón, D. Vázquez, L. Prada, L. Estrada, J. Alda, "Geometrical limits for UV-C inactivation of pathogens", Optik, 250, 168269 (2022). https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2021.168269.
- M. Raeiszadeh, B. Adeli, "A critical review on ultraviolet disinfection systems against COVID-19 outbreak: Applicability, validation, and safety considerations. ACS Photon. 7, 2941–2951 (2020). https://doi.org/10.1021/acsphotonics.0c01245.
- D. Vázquez, A. A. Fernández-Balbuena, J. Alda, J.C. Martínez-Antón, L. Estrada "Dispositivo de desinfección para fluidos que circulan a través de conductos mediante radiación UV" Patente ES2827843 B2 (2023)

# Respuesta inmunitaria a vacunas



# Manuel Gómez del Moral Martín

mgomezm@med.ucm.es

Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular (UCM)



## **Eduardo Martínez Naves**

emnaves@med.ucm.es

Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología (UCM)

na vacuna es un producto, en gran parte biológico, formado por un patógeno (virus, bacteria...) debilitado o inactivado, o partes del mismo, que no produce infección, con el que se entrena con "el engaño" al sistema inmunológico para que aprenda a reconocerlo como extraño y genere una memoria que ayude a eliminarlo eficazmente cuando la amenaza sea real; es decir, para proteger a personas o animales susceptibles de sufrir una enfermedad infecciosa.

# Inmunización y vacunas a lo largo de la historia

Griegos y romanos en el S.V a. C. ya sabían que, tras algunas epidemias, como la peste, los únicos que podían atender a los afectados, eran aquellos supervivientes o "inmunitarios" que ya habían padecido la enfermedad y se hacían resistentes a la misma de por vida, pero no a otras.

Turcos y chinos ya realizaban, desde el año 200 a.C., pequeños injertos de costras pulverizadas de viruela en la piel con las que evitaban la aparición de la enfermedad; práctica llamada variolación que importan los ingleses al Reino Unido en el siglo XVI. Y es el doctor Edward Jenner, en el siglo XVIII, el que, aplicando estos principios en niños sanos, desarrolló la primera vacuna para combatir la viruela en una época en la que era epidémica, al observar que un tipo de viruela que sufrían las vacas y las granjeras que las ordeñaban protegía a estas últimas de la viruela humana. La vacuna de la viruela humana utiliza por tanto un virus de la enfermedad de otra especie (las vacas) para proteger a los seres humanos.

Esta fue la primera y más exitosa vacuna de la historia, ya que gracias a ella la viruela se ha erradicado en todo el mundo.

Louis Pasteur (S. XIX) usó accidentalmente un cultivo atenuado (debilitado) de cólera de pollo y se dio cuenta, cuando repitió el experimento usando un cultivo fresco, que la forma debilitada protegía a los pollos de la forma virulenta de la enfermedad. Pasteur pasó a desarrollar una vacuna atenuada contra la rabia y la erisipela porcina. En honor a Jenner, Pasteur denominó a esta técnica "vacuna", derivado de la palabra latina vacca.

# Las vacunas vienen en distintas formas y composiciones

Hoy en día, se puede hablar de tres tipos de vacunas: vacunas de microoganismos atenuados, vacunas de microorganismo inactivados y vacunas de subunidades.

En las vacunas de microorganismos atenuados se usa una variante debilitada (atenuada) del microorganismo frente al que se quiere proteger, por ejemplo, en el caso de los virus, haciéndolos crecer muchas veces en cultivos celulares en el laboratorio. Los microorganismos atenuados pierden la patogenicidad y al inyectarlo al organismo a proteger, se replicará, aunque no va a producir enfermedad grave, pero sí mantiene su inmunogenicidad, es decir, será reconocido por el sistema inmunitario de forma potente, lo que puede generar algunas reacciones adversas como la fiebre. Esta respuesta será recordada por el sistema inmunitario y protegerá al individuo si se encuentra

con el microorganismo patogénico. Como ejemplo de este tipo de vacunas se puede mencionar la vacuna de la polio oral o el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que se usa como vacuna frente a la tuberculosis en algunos países.

Las vacunas inactivadas, utilizan microorganismos a los cuales se ha inactivado su capacidad de división (los microorganismos están muertos) mediante calor o con métodos químicos, para asegurar de esta manera que no causará enfermedad. Un inconveniente de estas vacunas es que no son tan inmunogénicas como las atenuadas, su capacidad para estimular al sistema inmune es menor, por lo que se necesita generalmente inyectar más dosis para alcanzar la protección, así como sustancias inmunoestimuladoras conocidas como adyuvantes, que deben inyectarse con el complejo vacunal. Ejemplos de estas vacunas son la de la Hepatitis A o la vacuna parenteral (inyectable) de la polio.

Otra alternativa para producir la estimulación del sistema inmunitario es el uso de vacunas de subunidades. Contienen solo partes del patógeno (por ejemplo la gripe) y que pueden producirse en el laboratorio de diferentes formas como: las recombinantes, en las cuales esas partes del patógeno se han producido por ingeniería genética en células no humanas (por ejemplo papiloma); las toxoides, por detoxificación de toxinas bacterianas (ejemplo tétanos, difteria); las vectoriales, utilizan virus inocuos modificados con el código genético del patógeno para que las células lo produzcan y el sistema inmune responda; vacunas de ácidos nucleicos, RNA del patógeno dentro de una nanopartícula lipídica que entrará en la célula y esta producirá proteínas del mismo (COVID-19) o DNA (todavía no existe ninguna en humanos, pero si para leishmaniosis en perros).

Sin lugar a duda, las vacunas son uno de los grandes avances de la medicina y la salud pública y una excelente medicina preventiva frente a infecciones. Previenen enfermedades, discapacidades, complicaciones y muerte. Protegen de forma individual, pero también colectiva (inmunidad de grupo o de "rebaño") porque evitan la propagación de las infecciones. La viruela se consiguió erradicar gracias a las vacunas y la poliomielitis está cerca de erradicarse. La pandemia de COVID-19 que puso en jaque al mundo del siglo XXI se ha podido controlar gracias al desarrollo de vacunas eficaces en muy poco tiempo. Sin embargo, sigue habiendo retos vacunales importantes como la malaria o el SIDA y se ha impulsado su

desarrollo dentro de las inmunoterapias frente al cáncer.

# ¿Cómo funcionan y estimulan al sistema inmunitario las vacunas?

Para responder esta pregunta primero hay que entender cómo se activa el sistema inmunitario frente a un patógeno.

El objetivo del sistema inmunitario es proteger (conferir inmunidad) al organismo frente a las infecciones. Esta inmunidad se desarrolla de forma inespecífica y rápida por la inmunidad innata y también de forma específica frente a un agente agresor concreto, mediante la inmunidad adaptativa. Ambas van de la mano y se activan de forma secuencial. Una buena vacuna activa esos dos componentes del sistema inmunitario.

La inmunidad innata es con la que nacen los individuos de una especie. Muy eficaz, comprende el brazo del sistema inmunitario más conservado evolutivamente y está formado por células y mecanismos cuya función es generar respuestas de manera rápida e inespecífica, constituyendo la primera barrera de defensa para el organismo. Reconoce grupos de patógenos (como bacterias, hongos, virus) que comparten patrones moleculares, denominados PAMPS (Pathogen-associated molecular patterns) a través de receptores denominados PRR (Pattern Recognition Receptors) y con los que no han estado en contacto previamente. Esta respuesta es muy rápida, ya que se activa de forma inmediata y actúa durante los primeros 5 días de la infección, y, si no la resuelve, impide que se expanda hasta que entren en acción los mecanismos de la inmunidad adaptativa, específica o adquirida, más lenta y evolutivamente más reciente (aparece en los vertebrados), pero que permite desarrollar una respuesta específica a un determinado patógeno con el que no se había tenido un contacto previo, o que ni siquiera existe, y lo más importante, genera una memoria inmunológica, de tal forma, que cuando el organismo vuelva a tener contacto con el mismo patógeno lo recordará, y la respuesta será más rápida y eficaz. Por lo tanto, la inmunidad adaptativa es muy potente y eficaz y tiene memoria (que puede conservarse durante años), pero es muy lenta, ya que tarda en activarse de forma efectiva entre una y dos semanas y durante este tiempo los patógenos pueden replicarse y producir la enfermedad. La vacunación busca activar la respuesta adaptativa (por eso se necesita vacunar contra cada

patógeno de forma específica) inoculando ese patógeno debilitado o partes de él para que la respuesta inmune adaptativa ya esté lista cuando se enfrente realmente a él y pueda eliminarlo rápidamente.

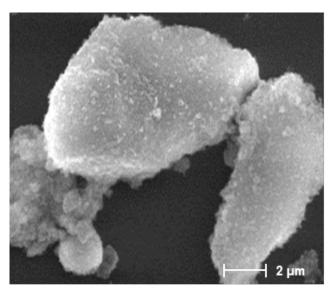
La inmunidad adaptativa presenta un mecanismo único de acción a través del cual dos tipos de células especializadas, los linfocitos B y los linfocitos T, experimentan una serie de cambios genéticos para generar numerosas y diversas formas de receptores moleculares que se unen a los antígenos (la parte concreta del patógeno a la que responde el sistema inmunitario) que son las inmunoglobulinas (anticuerpos) y los receptores de células T. Cuando los antígenos se unen a estas moléculas, junto a otras señales de coestimulación, se produce la proliferación selectiva de linfocitos específicos de antígeno, generándose de esta manera una respuesta inmunitaria específica. Las respuestas inmunitarias dirigidas por células T forman parte del tipo de respuesta conocido como mediada por células o celular. Por otro lado, las respuestas mediadas por anticuerpos específicos de antígeno producidos por células B se conoce como respuesta humoral y, junto con la respuesta celular, conforman los dos principales mecanismos de la inmunidad adaptativa. Cuando se ha resuelto una infección o el simulacro de esta (en la vacunación) quedarán células T y B circulantes de memoria de esa infección, que permitirán una respuesta más rápida del organismo cuando se vuelva a enfrentar al mismo agresor. También quedarán anticuerpos que pueden bloquear el patógeno de manera casi instantánea si se vuelve a exponer a él, se estará inmunizado.

#### Las vacunas necesitan un "empujón" de los adyuvantes

Aunque lo deseable con una vacuna es dejar una memoria inmunológica, es decir, activar la inmunidad adaptativa (células T y B), es muy importante la activación previa de la inmunidad innata, porque es la primera que actúa y es imprescindible para activar la inmunidad adaptativa. Para ello, es importante la presencia en los complejos vacunales de inmunoestimuladores o adyuvantes, sobre todo en las vacunas inactivadas o basadas en antígenos (de subunidades), más seguras frente a reacciones adversas, pero menos inmunoestimuladoras. Estos adyuvantes suelen simular los patrones moleculares presentes en los patógenos (PAMPS) o unirse a PRR, de tal forma que al coadministrarlos o unirlos al patógeno o partes del mismo, se harán más inmunogénicos, es decir, se conseguirá que el sistema inmunitario responda fuertemente contra estos.

Los adyuvantes, utilizados desde 1920, se pueden definir como compuestos o sustancias de naturaleza muy variada que mejoran la magnitud, amplitud y durabilidad de la respuesta inmunitaria de las vacunas dirigidas contra un antígeno que es administrado simultáneamente. Sin embargo, aunque muchos adyuvantes han demostrado una alta eficiencia en modelos preclínicos (animales de laboratorio), la mayoría no ha obtenido autorización en humanos, solo algunos basados en sales de aluminio, emulsiones de aceite y virosomas (envolturas virales).

Se pueden agrupar según diferentes criterios, como sus propiedades fisicoquímicas, origen o mecanismos de acción. Los adyuvantes potenciadores de la inmu-



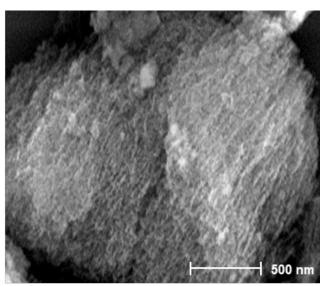


Figura 4. Imágenes de MSMPs con microscopía electrónica de barrido. En la imagen de la derecha se aprecia el carácter poroso de este material.

nidad contemplan aquellos que son capaces de inducir una respuesta proinflamatoria local mediante la activación del sistema inmunitario innato, lo que conduce al reclutamiento de células inmunitarias en el lugar de la invección. Concretamente, este tipo de adyuvantes pueden inducir varios mecanismos innatos a través de PRR al actuar como PAMPS. Los adyuvantes basados en sistemas de liberación consisten en la asociación de los antígenos con los compuestos adyuvantes, los cuales son portadores de éstos, siendo capaces de liberarlos de manera paulatina, favoreciendo así la disponibilidad de antígenos durante un largo período de tiempo. Los adyuvantes combinados consisten en el uso de formulaciones con diferentes adyuvantes que podrían desencadenar la activación de diferentes vías de señalización. La nanotecnología se ha abierto camino en el mundo de los sistemas de liberación de antígeno, y nano y micropartículas de diferente naturaleza han demostrado capacidad adyuvante en complejos vacunales. Partículas poliméricas (como los dendrímeros), orgánicas (como los liposomas) o inorgánicas (un ejemplo de estas son las Micropartículas de Silicio Mesoporoso (MSMPs), basadas en obleas de silicio) se caracterizan por ser biocompatibles, tener una elevada área superficial, ser fácilmente funcionalizables y ajustables en el tamaño de poro que alberga el antígeno (Figura 1). Han demostrado estimular el sistema inmunitario innato y adaptativo de forma antígeno específica en complejos vacunales.

# Algunos patógenos desafían el desarrollo de vacunas

Los retos que se presentan en el futuro de las vacunas son diversos y formidables ya que existen enfermedades infecciosas que causan un gran número de muertes en el mundo frente a las cuales todavía no se han podido desarrollar vacunas eficaces. Este es el caso de los parásitos, como la malaria, que infecta a más de 200 millones de personas y causa la muerte de más de 600.000 cada año. En general los parásitos tienen ciclos de vida extraordinariamente complejos y han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos muy sofisticados para evadir la respuesta inmunitaria, lo que dificulta enormemente el diseño de vacunas eficaces frente a ellos. Además, se da el caso de que las enfermedades parasitarias no son prioritarias en los planes de investigación de las compañías farmacéuticas porque afectan sobre todo a países del tercer mundo que carecen de recursos económicos. Aparte de los parásitos existen enfermedades como la tuberculosis (causada por

la bacteria Mycobactrium tuberculosis) o el SIDA (causada por el VIH) frente a los cuáles todavía no se han podido desarrollar vacunas realmente eficaces y que causan una alta mortalidad a nivel mundial. En ambos casos se trata de patógenos que han evolucionado para adquirir mecanismos de evasión e interferencias con el sistema inmunitario que dificultan mucho la labor de conseguir vacunas eficaces frente a ellos. Uno de los mecanismos utilizados por los patógenos para escapar de la respuesta inmunitaria es producir versiones cambiantes de los antígenos, estrategia que utilizan virus como el SIDA, la hepatitis C o la gripe. Esta es la razón por la que las vacunas de la gripe deben ser reformuladas todos los años puesto que el virus puede cambiar tanto de una temporada invernal a otra, de tal forma que ya sea irreconocible por el sistema inmunitario.

#### Vacunas antitumorales

El cáncer es otra de las dianas actual de las vacunas. se caracteriza por un crecimiento descontrolado de las propias células. Una célula normal se transforma en tumoral porque acumula en su ADN mutaciones que hace que pierda el control de su propia división. En algunos tumores esta transformación ocurre como consecuencia de una infección viral. Evidentemente, una vacuna que prevenga esas infecciones también será capaz de prevenir los tumores asociados a ellas, este es caso de la vacuna para el virus del papiloma. Las infecciones causadas por la transmisión sexual del virus del papiloma humano son eliminadas de forma eficaz por el sistema inmunitario en el 90% de los casos. Sin embargo, en el 10% restante la infección persiste y puede provocar cáncer de cérvix u otros tipos de cáncer anogenitales. En los últimos años se han desarrollado vacunas contra la infección de los virus del papiloma que son muy efectivas en la prevención de la infección y de sus tumores asociados.

Sin embargo, la mayoría de los tumores humanos no están causados por infecciones, sino que se asocian a mutaciones genómicas que se pueden producir por el mero azar o por exposición excesiva a agentes externos, como radiaciones (el sol, radiactividad) o compuestos químicos (como los presentes en el humo del tabaco). Estas mutaciones dan lugar a moléculas, casi siempre proteínas, alteradas que pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario como extrañas, lo que se conoce como antígenos tumorales. El problema es que las células cancerosas, como algunos patógenos, desarrollan mecanismos

de resistencia antitumoral y permiten que las células tumorales "escapen" del ataque del sistema inmunitario. El campo conocido como inmunoterapia antitumoral pretende desarrollar estrategias para potenciar la respuesta inmunitaria y evitar el escape de las células cancerosas. Una de las diferentes estrategias en la inmunoterapia contra el cáncer es lo que se conoce como vacunas antitumorales. Estas vacunas no serían preventivas, como en el caso de los patógenos, sino terapéuticas, es decir, se usan para el tratamiento de los tumores una vez diagnosticados. Se trata de utilizar antígenos tumorales, junto con adyuvantes, para activar o potenciar la respuesta inmunitaria y permitir que se elimine el tumor. Se ha avanzado mucho en los últimos años en este campo y se ha conseguido controlar tumores usando estas

estrategias en animales de laboratorio, pero todavía no se ha conseguido una vacuna anticáncer eficaz en seres humanos.

Existe una gran necesidad de nuevas y potentes vacunas antitumorales y también frente a patógenos que todavía causan altas tasas de mortalidad. Finalmente existe la amenaza constante de irrupción de nuevos patógenos, como el caso del SARS-CoV-2, que pueden producir pandemias debido a que la población carece de inmunidad lo que permite a los virus una expansión muy rápida. Por esta razón, es necesario mantener y fortalecer un sistema de investigación y desarrollo poderoso capaz de responder de forma eficaz a estos retos.



