

# Bionatura

Revista de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Clinical Biotec y el Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente



Ensayos Clínicos en Ecuador  
Dengue vaccine  
Enfermedad Renal poliquística  
Phage display technology  
Terapia cáncer  
*Orchidacea* en el sur de Ecuador  
*Mycobacterium bovis*

OPEN  ACCESS

INDEXED IN  
DOAJ



From the laboratory to the industry



# UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE



INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



[www.espe.edu.ec](http://www.espe.edu.ec)

## CAMPUS SANGOLQUÍ

Av. Gral. Rumiñahui s/n. Sangolquí. / Información: PBX +593 2 3989400 ext. 1081

INGENIERÍA CIVIL  
INGENIERÍA GEOGRÁFICA Y DEL MEDIO AMBIENTE  
INGENIERÍA MECÁNICA  
INGENIERÍA MECATRÓNICA  
INGENIERÍA EN ELECTRÓNICA, AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL  
INGENIERÍA EN ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
INGENIERÍA DE SISTEMAS E INFORMÁTICA  
INGENIERÍA AGROPECUARIA - HCDA. EL PRADO IASA I  
LICENCIATURA EN ADMINISTRACIÓN DE EMPRESAS  
LICENCIATURA EN FINANZAS Y AUDITORÍA  
LICENCIATURA EN MERCADOTECNA  
LICENCIATURA EN COMERCIO EXTERIOR Y NEGOCIACIÓN INTERNACIONAL  
LICENCIATURA EN CIENCIAS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA, DEPORTES Y RECREACIÓN  
LICENCIATURA EN CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN MENCIÓN EDUCACIÓN INFANTIL  
LICENCIATURA EN ADMINISTRACIÓN TURÍSTICA Y HOTELERA

## EXTENSIÓN LATACUNGA

Calle Quijano y Ordóñez y Hermanas Páez  
Belisario Quevedo, Barrio el Forastero. Información: 593 3 2810206 ext. 121

LICENCIATURA EN FINANZAS Y AUDITORÍA  
LICENCIATURA EN ADMINISTRACIÓN TURÍSTICA Y HOTELERA  
INGENIERÍA EN SOFTWARE  
INGENIERÍA AUTOMOTRIZ  
INGENIERÍA EN ELECTRÓNICA E INSTRUMENTACIÓN  
INGENIERÍA EN ELECTROMECAÁNICA  
INGENIERÍA MECATRÓNICA  
INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

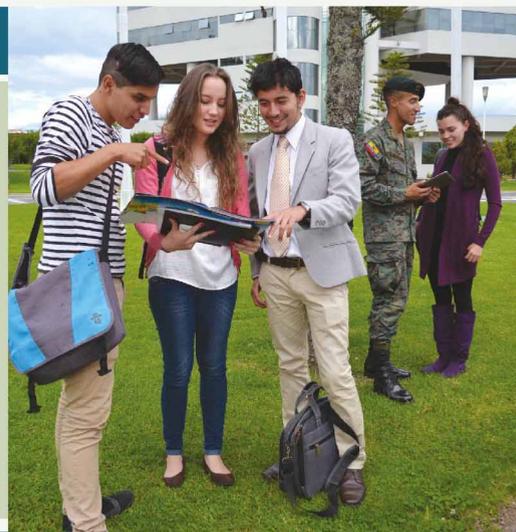
## IASA II STO. DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS - UNIDAD ACADÉMICA EXTERNA

Hacienda Zoila Luz, Km 23, vía Quevedo / Información: 593 2 2722246

INGENIERÍA AGROPECUARIA

## INSTITUTO DE IDIOMAS

Av. 6 de Diciembre 6289 y Tomás de Berlanga. Quito Información: 593 2 2244101 / 2268693 / 2457238





**Editorial**

Biotecnología / Biotechnology ————— 3  
 Nelson Santiago Vispo.

**Carta al Editor /Letter to editor**

Nuevas proyecciones de la investigación clínica en Ecuador /New projections of clinical research  
 in Ecuador ————— 4  
 Thelvia I. Ramos

**Investigation / Researchs**

A dose-response study in mice of the vaccine preparation containing the diiic-2 protein aggregated  
 with the oligodeoxynucleotide 39m / Estudio de dosis-respuesta en la preparación de la  
 vacuna que contiene la proteína agregada diiic-2 con 39m oligodeoxinucleótido en ratones ————— 6  
 Ernesto Marcos, Lázaro Gil, Alienys Izquierdo, Laura Lazo, Edith Suzarte, Iris Valdés, Angélica  
 García, Yusleydis Pérez, Yaremis Romero, Enma Brown, María G. Guzmán, Gerardo Guillén,  
 Lisset Hermida

Seguridad de la vacuna anti-idiotípica 1E10 en pacientes con tumores de diversas localizaciones  
 / Security 1E10 anti-idiotypic vaccine in patients with tumors of different locations ————— 13  
 Carmen Viada, Martha Fors, Elia Neninger, Saily Alfonso, Eduardo Santiesteban, Ivis Mendoza  
 , Pedro Guerra, Elena García, Leslie Pérez, Amparo Macías, Maurenis Hernández, Ana María  
 Vázquez

Non-coding chloroplast regions analysis within the Orchidaceae family in Southern Ecuador/  
 Análisis de regiones del cloroplasto no codificante dentro de la familia Orchidaceae en el sur de  
 Ecuador ————— 20  
 Ludeña Bertha, Cueva Augusta , Riofrio Lorena , Naranjo Carlos, Bastidas Cristian, Pintaud  
 Jean-Christophe,Suárez Juan-Pablo

**Revision/Review**

Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos anti-  
 infectivos / Display technology on filamentous phage in the searchfor anti-infective biological  
 agents ————— 22  
 Nelson Santiago Vispo, Frank Camacho, Maritza Pupo Antúnez, Roberto Toledo, Oliberto Sán-  
 chez Ramos

Enfermedad Renal Poliquistica / Polycystic Kidney Disease ————— 30  
 Pedro Cena Rivero, Rocío Elizabeth Castillo Andrade, Silvia Marcela Baquero, Viviana Marga-  
 rita Espirel

Mycobacterium bovis: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria / Myco-  
 bacterium bovis: realities and challenges for the veterinary biopharmaceutical industry ————— 35  
 Aníbal Domínguez Odio, Rafael Pérez Polanco, Isbel González Marrero, Raiselys Toirac Proen-  
 za, Yanelis Riquenes Garlobo, Yudit Rodriguez Coipel, Isis Acosta Guevara

From the laboratory to the industry: enzymatic production and applications of shortchain fruc-  
 tooligosaccharides (fos). Recent advances and current perspectives / Del laboratorio a la in-  
 dustria: producción y aplicaciones de fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) enzimática. ————— 41  
 Avances recientes y perspectivas actuales  
 LE. Trujillo, VE. Marcillo, R. Avalos, LK. Ponce, Thelvia I.Ramos

**Noticias y Opiniones / News and Views**

Paraíso natural ————— 44  
 Camila Barranco

# La Biotecnología

Es una disciplina científica en la cual los procesos biológicos, los organismos, las células y sus componentes son utilizados para el desarrollo de nuevas tecnologías. Nuevas herramientas y productos desarrollados por los biotecnólogos son utilizados en investigaciones, agricultura, industria y la clínica para ayudar a mejorar nuestras vidas y la salud del planeta. Hemos usado los procesos biológicos de los microorganismos por más de 6000 años para preparar la cerveza y el queso o preservar otros alimentos.

La biotecnología moderna ofrece productos innovadores y tecnologías para combatir las enfermedades, reducir nuestra huella ambiental, alimentar a los necesitados, utilizar energía más limpia y segura, y generar procesos industriales de fabricación más eficientes.

Actualmente, hay más de 250 productos farmacéuticos obtenidos por métodos biotecnológicos aplicados en la salud humana y pecuaria para el tratamiento de enfermedades antes incurables. Más de 18 millones de agricultores de todo el mundo utilizan la biotecnología agrícola para aumentar el rendimiento, evitar daños por insectos y plagas, y reducir el impacto de la agricultura sobre el medio ambiente. Se construyen biorrefinerías para probar y perfeccionar las tecnologías, para producir biocombustibles y productos químicos a partir de biomasa renovable, que puede ayudar a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo Sostenible (Río +20), que concluyó el 22 de junio del 2012, la División de Desarrollo Sostenible (DDS) elaboró un programa para que los gobiernos renovaran su firme compromiso político con el desarrollo sostenible y para promover la integración y la coherencia de las políticas y la implementación de acciones en los ámbitos social, económico y ambiental. Este "programa 21", en su capítulo 16 expone la gestión ecológicamente racional de la biotecnología por parte de las Naciones Unidas, y expone lo siguiente:

*"La biotecnología por sí misma no puede resolver todos los problemas fundamentales del medio ambiente y el desarrollo, de manera que las expectativas tienen que verse frenadas por el realismo. No obstante, cabe esperar que aporte una importante contribución facilitando, por ejemplo, una mejor atención de la salud, un aumento de la seguridad alimentaria mediante prácticas de agricultura sostenible, un mejor abastecimiento de agua potable, procesos de desarrollo industrial más eficaces para la elaboración de las materias primas, el apoyo a métodos sostenibles de forestación y reforestación, así como la desintoxicación de los desechos peligrosos. La biotecnología crea también nuevas oportunidades de establecer asociaciones en todo el mundo, especialmente entre los países ricos en recursos biológicos (incluidos los recursos genéticos) que carecen de los conocimientos especializados y las inversiones necesarias para aprovechar esos recursos por medio de la biotecnología y los países que cuentan con el caudal de conocimientos técnicos necesarios para transformar esos recursos biológicos de manera que atiendan a las necesidades del desarrollo sostenible".<sup>1</sup>*

Entre las áreas de los programas fundamentales del alcance de la biotecnología que se promulgan están:

- Aumento de la disponibilidad de alimentos, piensos y materias primas renovables;
- Mejoramiento de la salud humana;
- Aumento de la protección del medio ambiente;
- Aumento de la seguridad y establecimiento de mecanismos internacionales de cooperación;
- Establecimiento de mecanismos que faciliten el desarrollo y la aplicación ecológicamente racional de la biotecnología.

Todas estas áreas permitirán el desarrollo y la aplicación acelerados de la biotecnología, particularmente en los países en desarrollo, requiriendo un esfuerzo importante para fortalecer las capacidades institucionales en los planos nacional y regional.

En los países en desarrollo donde escasean los factores habilitantes tales como la capacidad de formación, los conocimientos técnicos, las instalaciones y fondos para investigación y desarrollo, la capacidad para la creación de una base industrial, el capital (incluso el capital de riesgo), la protección de los derechos de propiedad intelectual y los conocimientos en esferas como la investigación del mercado, la evaluación tecnológica, socioeconómica y de la seguridad. Por consiguiente, será necesario realizar esfuerzos para establecer la capacidad en estas y otras esferas y que estos esfuerzos se complementen con suficiente apoyo financiero.

Por lo tanto será preciso fortalecer la capacidad endógena de los países en desarrollo mediante nuevas iniciativas internacionales de apoyo de la investigación a fin de acelerar el desarrollo y la aplicación de la biotecnología nueva y tradicional para responder a las necesidades del desarrollo sostenible en los planos local, nacional y regional. Como parte de este proceso deberían crearse mecanismos nacionales que permitan tener en cuenta la opinión fundamentada del público con respecto a la investigación y la aplicación de la biotecnología. En este sentido "el Gobierno de Ecuador se ha propuesto dar un impulso decisivo al desarrollo de la ciencia y la tecnología como piezas "fundamentales para el desarrollo", expreso recientemente el presidente Rafael Correa durante una conferencia en New Haven (EEUU).

Según el mandatario, los países que no generan suficientes conocimientos se quedan rezagados y dependen de lo que producen otros, por lo que, de no reducir las distancias con relación a los más avanzados en materia de educación, ciencia y tecnología, el futuro que les espera es de subordinación. Correa expresó esas ideas al pronunciar una conferencia en la Universidad de Yale, en New Haven (Connecticut, EEUU), donde fue recibido por sus autoridades y se reunió con académicos y responsables de centros de investigación. Se trata de impulsar, de este modo, el avance del país andino hacia la "economía social del conocimiento", un modelo inclusivo que, según el Gobierno, será muy útil en la necesaria mejora de la productividad para el país, así como en la generación de empleo y en el crecimiento económico.

Correa, sin embargo, aseguró que su gobierno no cree en "el absolutismo tecnicista" que organiza a la sociedad en función de requisitos tecnológicos, sino en un avance sostenido en materia de educación superior orientada hacia la ciencia, la innovación y la tecnología.

La revista Bionatura es un fiel exponente de considerar el desarrollo basado en el conocimiento de las ciencias biológicas y la aplicación de las mismas al desarrollo sostenibles del planeta, en aras de un mejor aprovechamiento de los recursos naturales para el beneficio de todos.

## Referencias Bibliográficas

- Naciones unidas. Gestión ecológicamente racional de la Biotecnología. Programa 21. Capítulo 16. [Internet]. [Consultado: 4 de abril de 2015]. <http://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/agenda21spchapter16.htm#1/>

\*Profesor - investigador Yachay Tech. Ecuador / [nvispo@yachaytech.edu.ec](mailto:nvispo@yachaytech.edu.ec)

## Nuevas proyecciones de la investigación clínica en Ecuador.

### New projections of clinical research in Ecuador.

Thelvia I. Ramos <sup>1</sup>

#### RESUMEN

El desarrollo acelerado de la Industria Biofarmacéutica, y en particular de la industria de productos biológicos ha traído consigo el incremento de la investigación clínica y el fortalecimiento de las agencias reguladoras para alcanzar el registro del producto en estudios en el menor tiempo y con la calidad requerida bajo las normativas de las Buenas Prácticas Clínicas. Para perfeccionamiento de este tipo de investigación surgen las Organizaciones de Investigación por Contrato (CRO), las cuales permiten el desarrollo de la investigación y proporcionan servicios que van desde los estudios preclínicos, hasta la conducción y realización de los ensayos clínicos. Deben manejar las particularidades del producto en estudio, para demostrar su seguridad, eficacia y entrada al mercado farmacéutico con una indicación precisa. En este artículo ponemos en su conocimiento la primera CRO en el Ecuador que cumple con estos estándares para la investigación clínica.

**Palabras clave:** Biofarmacéutica; ensayos clínicos; Organización de Investigación por Contrato.

#### ABSTRACT

The accelerated development of the pharmaceutical industry, particularly the industry of biologics products, has brought an increase in clinical research and strengthening regulatory agencies to achieve product registration studies in the shortest time and with the required quality under the rules of Good Clinical Practice. For improvement of this type of research arise Contract Research Organizations (CRO), which allow the development of research and provide services ranging from preclinical studies to conducting and realization of clinical trials. For instance, these companies should know the peculiarities of the product and, to demonstrate safety, efficacy and entrance to pharmaceutical market with a precise indication. In this article we hereby inform you the first CRO in Ecuador to meet these standards for clinical research.

**Keywords:** Biopharmaceutical; clinical trials; Contract Research Organization (CRO).

### Introducción

Un ensayo clínico no es más que un estudio metódico, dirigido a dar respuesta ante el uso de un producto y/o especialidad médica, el cual está estructurado sobre el método científico. Su objetivo primordial es considerar que la investigación sea segura en seres humanos, demostrar algún grado de eficacia para una indicación terapéutica, profiláctica o diagnóstica determinada y describir los posibles eventos adversos que pudieran presentarse en el transcurso de la investigación.<sup>1</sup>

Los ensayos clínicos van transitando de forma cronológica por una serie de fases, que van desde la Fase I a la Fase III, posterior a esto se logra su comercialización o autorización para su aplicación del producto en estudio; y, una vez comercializado el medicamento, los ensayos clínicos que se realicen con él pertenecerán a la fase IV o Farmacovigilancia<sup>2</sup>.

El desarrollo acelerado de la Industria Biofarmacéutica, y en particular de la industria de productos biológicos ha traído consigo el incremento de la investigación clínica, teniendo en consideración el grado de novedad de las sustancias que se desarrollan.

En la actualidad nos encontramos con necesidades médicas no satisfechas que constituye el motor impulsor del progreso irrefutable en el ámbito sanitario y suponen un reto para toda la comunidad científica. El desafío es aún mayor teniendo en cuenta los cambios demográficos y las enfermedades emergentes y re-emergentes. De ahí el desarrollo de la Biotecnología como rama de las Ciencias Biológicas para dar respuesta a estas interrogantes, integrando el desarrollo de los novedosos productos de síntesis biológica a través del conocimiento de las diversas vías metabólicas

y procesos inherentes a cada una de las afecciones. En la actualidad además, confluyen las particularidades inmunológicas y genéticas de los individuos de manera, que este proceso a partir de la Biotecnología permite que nos adentremos en la medicina individualizada<sup>3</sup>.

Para superar estos retos científicos y médicos a los que nos enfrentamos en la actualidad, es necesaria la participación de todos los agentes implicados. La realización de estos estudios trae por consecuencia la necesidad de que el personal involucrado con esta actividad conozca los documentos normativos para la Solicitud de Autorización y Modificación de Ensayos Clínicos, donde se abordan aspectos técnicos, metodológicos, legales y administrativos del trámite, así como otras Regulaciones relacionadas con el tema, que permiten la agilidad, coherencia y desarrollo de esta actividad<sup>3</sup>.

La importancia de establecer una estrategia adecuada para la evaluación clínica de los productos en desarrollo, constituye un elemento clave para alcanzar el Registro en el menor tiempo y con la calidad requerida en el contexto de las Buenas Prácticas Clínicas. Estos estudios también deben realizarse en condiciones de respeto a la dignidad, la protección de los derechos y bienestar de los sujetos en investigación; se debe salvaguardar su integridad física y mental, así como su intimidad y la protección de sus datos<sup>4,5</sup>.

Por otro parte la regulación de los ensayos clínicos por el Estado es un proceso en constante cambio y adecuación, cuyo reto actual consiste en salvaguardar la seguridad de los participantes. Una de las funciones de las autoridades sanitarias en el mundo es proteger los intereses de los pacientes que participan en un ensayo clínico (EC) y exigir el cumplimiento de un conjunto de recomendaciones que se conocen como las Normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC). Estas reglamentaciones son estándares éticos y científicos internacionalmente aceptados, que establecen indicadores para el diseño, conducción, registro y reporte de los estudios que involucran la participación de seres humanos y cuyo

<sup>1</sup> Dra. Thelvia I Ramos. MD. Especialista en Genética Clínica y Molecular. M.Sc. en Biotecnología Mención Ensayos Clínicos. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura.

**Autor de correspondencia:** Dra. Thelvia I. Ramos. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura.



cumplimiento asegura que sus derechos, bienestar, seguridad y dignidad sean protegidos y respetados. A lo largo de los años se han establecido regulaciones en la investigación clínica en numerosos estados. Muchos países latinoamericanos disponen de políticas reguladoras que garantizan la seguridad de los nuevos productos biológicos y biotecnológicos que se evalúan clínicamente en seres humanos <sup>6</sup>. Ecuador se encuentra inmerso en la elaboración de sus lineamientos y reglamentaciones que regulen la actividad de los EC dentro del país <sup>7</sup>.

La realización de los ensayos clínicos requiere de conocimientos integrales en diversas áreas, como la Bioética, la implementación de un centro de investigación, el seguimiento del ensayo, su seguridad, aspectos legales y, la normativa nacional e internacional que rige la realización de la investigación clínica <sup>8</sup>.

Para la conducción de los ensayos clínicos debido a las diversas normativas internacionales y para el desarrollo de este tipo de investigación surgen las Organizaciones de Investigación por Contrato (CRO), las cuales permiten el desarrollo de la investigación con el cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas y deberá implementar la garantía y el control de calidad <sup>9</sup>. Estas organizaciones son contratadas por el promotor del producto en investigación (individuo, empresa, institución u organización responsable de realizar, financiar y gestionar un ensayo clínico), pero son independientes de este, evitándose conflictos de intereses y brindando apoyo a las industrias farmacéuticas y biotecnológicas, en forma de servicios de investigación. Es el tipo de empresa de naturaleza pública o privada, nacional o extranjera legalmente constituida en el país, a la cual el patrocinador/promotor, transfiere legalmente algunas o todas sus funciones y/o actividades relacionadas con un estudio de investigación. Entre sus objetivos se destacan <sup>8</sup>:

- Apoyar y ayudar a los Promotores de la Investigación Clínica a realizar y desarrollar los ensayos clínicos, aportando especialización, experiencia y conocimiento de los ensayos clínicos.

- Asegurar que los ensayos clínicos se realizan de acuerdo a las normas éticas y metodológicas establecidas, cumpliendo fielmente la normativa aplicable.

- Garantizar la veracidad, y trazabilidad de los resultados que finalmente formaran parte del dossier de registro y comercialización de un determinado fármaco o tratamiento, como compañía independiente También selecciona al investigador principal y le proporcionan apoyo, lo mantienen informado, sobre cualquier particularidad de relevancia sobre el producto que surja en referencia al medicamento en investigación, asimismo realizan la monitorización del estudio <sup>10</sup>. Además la interacción con los Comités de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) al inicio y en el transcurso de la investigación sobre las particularidades del producto y las evaluaciones de seguridad de los sujetos incluidos en el estudio <sup>11</sup>.

Una CRO puede proporcionar servicios que van desde los estudios preclínicos, la investigación clínica y dirección de ensayos clínicos. Dependen para su existencia de las compañías farmacéuticas, las cuales patrocinan los ensayos clínicos. Los datos que se obtiene al realizar las diferentes investigaciones clínicas son utilizados por las compañías farmacéuticas, para levantar toda la evidencia científica del producto, poder patentarlo, obtener registros sanitarios y sacarlo al mercado. A pesar de esta amplia gama de actividades que pueden desarrollar, muchas de ellas solo son contratadas para el desarrollo de alguna de las fases de ensayo clínico, pues no tiene la fortaleza suficiente para asumir todos los roles que le corresponden; solo lo hacen aquellas que cuentan con la experticia necesaria y suficiente de su personal, que conoce todas las regulaciones nacionales e internacionales rigurosas a las que se enfrenta un producto antes de salir al mercado <sup>12</sup>.

Es requisito indispensable para estas compañías manejar las particularidades del producto en estudio, para que pueda demostrarse su seguridad, eficacia y lograr entrar al mercado farmacéutico con una indicación precisa.

En Ecuador es necesario contar con este tipo de compañías y surge Clinical Biotec, una Organización de Investigación por Contrato (CRO), constituida por un grupo de especialistas altamente calificados y con experiencia de más de 20 años en el campo de la investigación clínica. Esta nueva CRO, brinda servicios de elevada calidad metodológica y con precios competitivos. Sus servicios están sustentados por procedimientos estandarizados de trabajo que permiten obtener una calidad estable y enfocada a la mejora continua.

El objeto social de Clinical Biotec, es la implementación y conducción de investigaciones clínicas (investigaciones realizadas para demostrar eficacia y seguridad de nuevos productos médicos ya sea de origen natural, sintéticos o biológicos incluyendo equipos médicos, reactivos bioquímicos y nuevos procedimientos médicos y quirúrgicos), así como el manejo de sitios clínicos para la realización de las mismas fuera y dentro del Ecuador y el entrenamiento de profesionales de la salud en este campo. Esta organización por contrato tiene la particularidad de introducir ensayos clínicos con preferencia por productos de origen biotecnológico, que constituyen novedosas estrategias terapéuticas dirigidas a la medicina individualizada.

También combina las funciones de una CRO y una SMO para cumplir la creciente demanda de la investigación clínica en la República del Ecuador.

## Referencias

- 1 CPMP/ICH/135/95. Guía ICH de BPC. Enero de 1997.
- 2 ICH E6 Good Clinical Practices.
- 3 Preparation and implementation of a clinical protocol. En: Chow S-Ch, Liu, J-P. Design and Analysis of Clinical Trials: Concepts and Methodologies. 2nd Edition. Hoboken, New Jersey. 2010.
- 4 U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Institutional Review Boards and Clinical Investigators. 1998 Update. [Sitio en Internet] Disponible en <http://www.fda.gov>.
- 5 Comisión Europea. Propuesta de un Nuevo Reglamento Sobre los Ensayos Clínicos de Medicamentos de uso humano [Internet]. Bruselas: COMISION; 2012 [citado el 17 de setiembre del 2012]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2012:0369:FIN:ES:PDF>.
- 6 OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud) Red Panamericana para la Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. Buenas Prácticas Clínicas: Documento de las Américas. IV Conferencia Panamericana sobre Armonización Reglamentación Farmacéutica. Rep. Dominicana, 2-4 marzo, 2005. Disponible en: [www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/ivconf-BPC-doct-esp.dopc](http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/ivconf-BPC-doct-esp.dopc) (Citado el 17 de marzo de 2011).
- 7 EL DIRECTORIO DE LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA - ARCSA. Ministerio de Salud Ecuador.
- 8 Normas de Buena Práctica Clínica: versión en español. Inspección de Buena Práctica Clínica. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Disponible en: <http://www.aemps.es/actividad/sgInspeccion/docs/guiaBPC-oct08.pdf>.
- 9 (Guía de la ICH sobre la Estructura y Contenido de los informes de Estudios Clínicos y otras guías ICH apropiadas para el diseño protocolo y realización del ensayo.)
- 10 NORMAS DE BUENA PRÁCTICA CLINICA (CPMP/ICH/135/95) 2002.
- 11 Conferencia internacional de armonización (ciarm) Requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso en humanos. Guía tripartita armonizada de la conferencia internacional de armonización. Lineamientos para la buena práctica clínica. 2010.
- 12 <http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001393/139309s.pdf>: Guía No 1: Creación de Comités de Bioética. UNESCO.

## A dose-response study in mice of the vaccine preparation containing the diic-2 protein aggregated with the oligodeoxynucleotide 39m

### Estudio de dosis-respuesta en la preparación de la vacuna que contiene la proteína agregada diic-2 con 39m oligodeoxinucleótido en ratones

Ernesto Marcos<sup>1</sup>, Lázaro Gil<sup>1</sup>, Alienys Izquierdo<sup>2</sup>, Laura Lazo<sup>1</sup>, Edith Suzarte<sup>1</sup>, Iris Valdés<sup>1</sup>, Angélica García<sup>2</sup>, Yusleydis Pérez<sup>1</sup>, Yaremis Romero<sup>1</sup>, Enma Brown<sup>1</sup>, María G. Guzmán<sup>2</sup>, Gerardo Guillén<sup>1</sup>, Lisset Hermida<sup>1</sup>

#### RESUMEN

The Cuban dengue vaccine program relies on the subunit vaccine based on two specific viral regions: the domain III of the envelope protein and the capsid protein. Previously, we reported the immunogenicity and protection capacity in mice and monkeys of the chimeric protein DIIC-2, formed by the two described viral regions, highly aggregated with the ODN 39M and adjuvanted in alum. In the present work, different quantities of the ODN 39M were tested for their immunogenicity in mice. As a result, the formulation containing the protein aggregated with 2 µg of the ODN was the optimal condition in terms of cell-mediated immunity thereby; it was selected to be further studied. The second mice experiment was directed to study the effect of the formulation dose on their immunogenicity and protective capacity. Results revealed the best immunogenicity profile for the lowest quantity tested whereas the protection assay revealed an inverse behavior. Upon virus challenge, the group inducing the lowest immune response generated the best protection profile and only 40% of protection was obtained in the group generating the highest immunogenicity. Taken together we strongly recommend performing a dose study in non-human primates to find the optimal dose for inducing the best protective response.

**Keywords:** Dengue, vaccine; viruses; immunogenicity; experiment; study.

#### ABSTRACT

El programa de vacuna contra el dengue cubano confía en la vacuna de subunidades basado en dos regiones virales específicas: el dominio III de la proteína de la envoltura y la proteína de la cápsida. Anteriormente, se informó de la capacidad de inmunogenicidad y protección en ratones y monos de la proteína quimérica DIIC-2, formado por las dos regiones virales descritos, muy agregados con el ODN 39M y adyuvadas en alúmina. En el presente trabajo, diferentes cantidades de la ODN 39M se ensayaron para determinar su inmunogenicidad en ratones. Como resultado, la formulación que contiene la proteína agregada con 2 g de la ODN fue la condición óptima en términos de la inmunidad mediada por células de ese modo; fue seleccionado para estudiar más a fondo. El segundo experimento los ratones fue dirigida para estudiar el efecto de la dosis de la formulación en su inmunogenicidad y capacidad protectora. Los resultados revelaron el mejor perfil de inmunogenicidad para la cantidad más baja ensayada, mientras que la protección de ensayo reveló un comportamiento inverso. Tras la exposición al virus, el grupo de inducción de la respuesta inmune más bajo genera el mejor perfil de protección y se obtuvo sólo el 40% de la protección en el grupo de la generación de la más alta inmunogenicidad. En conjunto le recomendamos realizar un estudio de dosis en los primates no humanos para encontrar la dosis óptima para inducir la mejor respuesta protectora.

**Palabras clave:** Dengue, vacunas; virus; inmunogenicidad; experimento; estudio.

## Introduction

Dengue virus (DENV) is a mosquito-borne *flavivirus* and the causative agent of dengue and severe dengue. This pathogen is endemic in 100 countries in tropical and subtropical regions where 2.5–3.6 billion people are at risk for infection. An estimated 390 million cases of DENV infection occur annually, 96 million of which are apparent, 500,000 severe, and 20,000 fatal.<sup>1</sup>

There are several dengue vaccine candidates at advanced pre-

clinical and clinical levels although no vaccine is still licensed. The most advanced strategies (Phase II-III) are based on live attenuated viruses and are led by the Sanofi Pasteur's ChimeriVax™-dengue vaccine candidate. Despite the balanced reactogenicity and immunogenicity profile of the tetravalent ChimeriVax™-dengue vaccine candidate, three doses are required during one year to induce high neutralizing antibody seroconversion rates against

<sup>1</sup> Vaccines Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ave. 31, P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba.

<sup>2</sup> Virology Department, Tropical Medicine Institute "Pedro Kouri", PAHO/WHO Collaborating Center for the study of Dengue and its vector, Autopista Novia del Mediodía, km 6 ½ P.O. Box Marianao 13, Havana 11 600, Cuba.

**Corresponding author:** Lisset Hermida Cruz. P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba. Phone: 53-7-2504535, Fax: (53-7) 271 4764. Email: lisset.hermida@cigb.edu.cu

the four serotypes.<sup>2</sup> Despite such levels of immunity, unfortunately, the three efficacy trials revealed lack of solid protection against DENV-1 and DENV-2.<sup>3</sup> In addition, neither data is available about the induction of functional cell-mediated immunity (CMI) not about the duration of the protective induced immunity post-vaccination.

The Cuban dengue vaccine program relies on the subunit vaccine based on two specific viral regions: the domain III (DIII) of the envelope (E) protein and the capsid (C) protein. Domain III of the E protein has been proposed for involvement in receptor recognition,<sup>4</sup> as supported by several studies.<sup>5,6</sup>

On the other hand, CMI has also recently been recognized as an important factor in protection against DENV in mice and humans<sup>7-10</sup> therefore, we also selected the C protein as a potential viral target for inducing CMI. We have then designed and obtained a novel chimeric protein: Domain III-capsid, serotype-2, combining both viral fragments potentially inducer of neutralizing antibodies and CMI. When this protein was presented as particulate aggregate including ODNs, it induced antiviral and neutralizing antibodies, CMI, and conferred a significant level of protection in mice.<sup>11</sup> In addition, when this chimeric protein was administered in monkeys positive to DENV-2, it significantly boosted the neutralizing antibodies, which were maintained until 6 months.<sup>12</sup>

In following experiments, we used three types of defined ODNs for the aggregation of DIIIIC-2 and observed that the nature of the ODN determines the magnitude of the cellular immune response induced by the protein in mice.<sup>13</sup> Based on this result, we selected the ODN 39M to conduct experiments in transgenic mice as well as in non human primates (NHP). The preparation containing protein DIIIIC-2 and the ODN 39M, adjuvanted in alum, elicited neutralizing antibodies and protected transgenic mice and NHP against challenge with DENV-2, constituting the proof on concept of this molecule.<sup>13,14</sup>

Based on the aforementioned results the present work is directed to study the influence of the quantity of the ODN 39M, or the mixture protein-ODN, on the immunogenicity and protective capacity in mice of the final formulation.

## Methods

### Viruses

A preparation from suckling mice brain infected with DENV-2 (NGC strain) was used as antigen for antibody detection (Clarke and Casals, 1958). A similar preparation obtained from brains of non inoculated mice was used as a negative control. For virus challenge a preparation of infective DENV-2 (A15 strain) ( $4.5 \times 10^5$  pfu/mL) was used. It was obtained by homogenization of suckling mice brain infected with DENV-2 RPMI-1640 medium. For animal immunization and neutralizing antibodies detection, clarified cell culture supernatant harvested from Vero cells infected with DENV-2 (SB8553 strain, kindly provided by Dr. M.J. Cardosa, University Sarawak, Malaysia) ( $10^5$  pfu/mL) was used as viral stock. A concentrated preparation of DENV-2 was used for the *in vitro* stimulation of mouse splenocytes. Supernatant from Vero cells infected (100 mL) with  $10^6$  pfu/mL of SB8553 DENV-2 strain was concentrated by centrifugation at 32,000 rpm for 4 h at 4°C. The pellet containing the virus was resuspended in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS). A mock preparation was similarly prepared from the supernatant of uninfected Vero cells.

### Mice

Female BALB/c (Bc, H-2d) mice (aged 6–8 weeks) were purchased from the CENPALAB (Havana City, Cuba), and housed in

appropriate animal care facilities during the experimental period. Animals were handled according to the Cuban Institute of Health Guidelines for the humane use of laboratory animals.

### Purification of the recombinant protein DIIIIC-2

The purification of the recombinant protein was basically according to Marcos et al, 2013. Briefly, the supernatant from disruption in TE buffer was exchanged to 10 mM Tris/HCl, 7 M Urea, Tween 0.5%, pH 8 using Sephadex G25 fine (Pharmacia, Sweden). The supernatant was gently shacked during 1 h at 4 °C before the application onto the SP Sepharose FF resin (Pharmacia, Sweden), with the same buffer. The column was washed with 30 mM DEA, 7 M Urea, Tween 0.5%, 200 mM NaCl, pH 10.3 (washed buffer), to eliminate contaminants. Then, the recombinant protein was eluted using 30 mM DEA, 7 M Urea, Tween 0.5%, 750 mM NaCl, 15 mM Imidazole, pH 10.3 (elution buffer). For the second chromatography step the elution from the SP Sepharose column (containing the protein DIIIIC-2, 65% of purity) was applied onto the Chelating Sepharose FF resin (Pharmacia, Sweden), previously equilibrated with the same buffer. The protein was eluted using 30 mM DEA, 7 M Urea, Tween 0.5%, 750 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 10.3. Finally the protein was refolded using Sephadex G25 fine to TE buffer and was stored at -20 °C until next experiments.

### Study of the effect of the 39M ODN quantity on the DIIIIC-2 precipitation

The purified protein DIIIIC-2 was subjected to an *in vitro* assembly procedure as previously described with few modifications.<sup>15</sup> Briefly, 400 µg of the recombinant protein DIIIIC-2 were incubated with the ODN 39M (ATCGACTCTCGAGCGTTCTC-GGGGGACGATCGTCGGGGG) in TE buffer. The reaction mixture was incubated for 30 min at 30°C and finally stored at 4°C. To study the relationship between the quantity of the ODN 39M and the protein DIIIIC-2 precipitation, different *in vitro* assembly reactions were carried out varying the final concentration of the ODN. The reactions were assessed as described above and each condition was made by triplicate. The table 1 shows the conditions evaluated in the experiment.

After the incubation period, the reactions were centrifuged 10 min at 12 000 g and the supernatant was collected. The quantity of precipitated DIIIIC-2 was calculated by the difference between the initial DIIIIC-2 added to the reaction and the remaining

**Table 1.** Quantity of ODN 39M used for aggregation reactions

Reaction	Quantity of ODN 39M (µg)
1	1.7
2	2.0
3	4.0
4	8.0
5	10.0
6	13.3
7	20.0
8	30.0
9	40.0
10	57.1
11	80.0
12	100.0
13	133.3
14	200.0

DIIC-2 present in the supernatant. The DIIC-2 concentration was determined by the Bicinchoninic Acid Protein Assay kit (Sigma, Missouri, USA) following the procedure recommended by the manufacturer.

To quantify the concentration of the ODN 39M present in the supernatant of the *in vitro* assembly reactions, 5 µL of the sample were diluted in 2 mL of TE buffer and the absorbance at 260 nm was determined.

## Mice experiments

### Mice experiment #1

An immunization schedule was conducted to study the effect of the quantity of the ODN 39M on the immunogenicity of the final preparation containing DIIC-2, and adjuvanted in alum. Seven groups were included (table 2).

Mice received three doses at 0, 15 and 30 days, by intraperitoneal route. In the case of the positive control group, animals received only one dose of the infective virus ( $10^5$  pfu) by sc route, without adjuvant. Animals from each group were partially bled 30 days after the last dose and sera were collected for further immunological analysis. One month after the last dose they were splenectomized to study the cellular immune response.

### Mice experiment #2

A second immunization schedule was conducted to study the effect of the quantity of the total preparation 39M-DIIC-2, adjuvanted in alum, on their immunogenicity and protective ca-

**Table 2.** Immunization Schedule 1. Study of the ODN 39M quantity

Group	DIIC-2 quantity (µg)	ODN 39M quantity(µg)	Number of animals
1	20	-	10
2	20	0.09	10
3	20	0.4	10
4	20	2.0	10
5	20	3.0	10
6 (Placebo)	-	-	10
7 (DENV-2)	DENV-2 $10^5$ pfu	-	10

capacity. The quantities assayed as well as the different groups of animals are described in table 3.

Mice received three doses at 0, 15 and 30 days, by intraperitoneal route. In the case of the positive control group, animals received only one dose of the infective virus ( $10^5$  pfu) by sc route, without adjuvant. Animals from each group were partially bled 30 days after the last dose and sera were collected for further immunological analysis. One month after the last dose they were splenectomized to study the cellular immune response.

### Protection assay

One month after the last dose, twelve animals from each group were intracranially injected with 20 µL of a suspension of DENV-2 infected suckling mouse brain containing 50 median lethal doses ( $LD_{50}$ ) ( $1.6 \times 10^3$  pfu/ml). Mice were observed daily for 21 days and deaths were recorded. The maintenance and care of experimental animals used in this research complied with the Cuban Institute of Health Guidelines for the humane use of laboratory animals.

### Detection of anti DENV-2 IgG antibodies

An amplified sandwich ELISA system was used to detect the anti DENV-2 IgG antibodies. Polystyrene plates with 96 wells (Cos-

**Table 3.** Immunization Schedule 2. Study of the 39M-DIIC-2 quantity

Group	39M- DIIC-2 quantity (µg)	Number of animals
1	2.5	22
2	5	22
3	20	22
4 (Placebo)	-	22
5 (DENV-2)	DENV-2 $10^5$ pfu	22

tar, Cambridge, MA) were coated for 2 h at 37°C with 100 µL per well of a mixture of anti DENV human immunoglobulins (IgG) (5 µg/mL) in coating buffer (0.16%  $Na_2CO_3$  and 0.29%  $NaHCO_3$ ; pH 9.5); then they were blocked in coating buffer containing 5% powder skim milk for 1 h at 37°C and washed three times in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). The viral antigen (100 µL per well) and the negative control antigen were incubated overnight at 4°C. After three washes with PBS-T, 100 µL per well of sera from each group were tested by serial dilutions in PBS-T, starting at 1:1 000. Plates were incubated for 1 h at 37°C and washed as described above. Later, 100 µL per well of 1:35 000 diluted anti mouse IgG peroxidase conjugate (Amersham Pharmacia, Beckinghamshire, U.K.) were added and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After washing, 100 µL per well of 0.04% substrate *O*-phenylenediamine in buffer (2%  $Na_2HPO_4$  and 1% citric acid; pH 5.0) was added. The plates were kept for 30 min at room temperature and the reaction was stopped with 50 µL per well of 2.5 M  $H_2SO_4$ . Absorbance was read at 492 nm in a SensIdent Scan device (Merck, Helsinki, Finland). The positive cutoff value was set as twice the mean absorbance value of the negative control sera.

### Plaque reduction neutralization test

Neutralizing antibody titers were measured by plaque reduction neutralization test (PRNT) in VERO cells as previously described.<sup>16</sup> The strain DENV-2 SB8553 was used in this test. The neutralizing antibody titer was identified as the highest serum dilution that reduced the number of virus plaques by 50%. As a positive control, a murine hyperimmune ascitic fluid was used which recognizes the antigens on the surface of DENV-2.

### Cell culture and viral stimulation

Spleen cells were obtained in aseptic conditions and erythrocytes were lysed by adding  $NH_4Cl$  0.83% solution. Cells were washed twice with PBS 2% Fetal Bovine Serum (FBS) (PAA Laboratories, Ontario, Canada) and resuspended at  $2 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco, UK), 2 mM glutamine (Gibco, UK),  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol (Sigma St. Louis, MO) and 5% FBS. Finally  $2.5 \times 10^5$  cells/well were cultured in 96 well round bottom plates with the antigens ( $1.25 \times 10^4$  pfu and  $2.5 \times 10^5$  pfu of DENV-2 antigen for mice experiment # 1 and # 2, respectively) or mock preparation. Concanavalin A (Sigma St. Louis, MO) was used as a positive control. In all experiments three wells were plated for each antigen. After 4 days of culture, culture supernatants were collected and stored at -20 °C.

### Cytokine detection

The culture supernatants from splenocytes previously stimulated with each antigen were analyzed in duplicate to determine the IFN-γ concentration by ELISA using monoclonal antibodies (MAb) pairs (INF-γ; Mabtech, Nacia, Sweden). ELISA protocol recommended by manufacturers was used with slight modifications. The lowest limit of detection of cytokine was 4 pg/mL.

## Statistical analysis

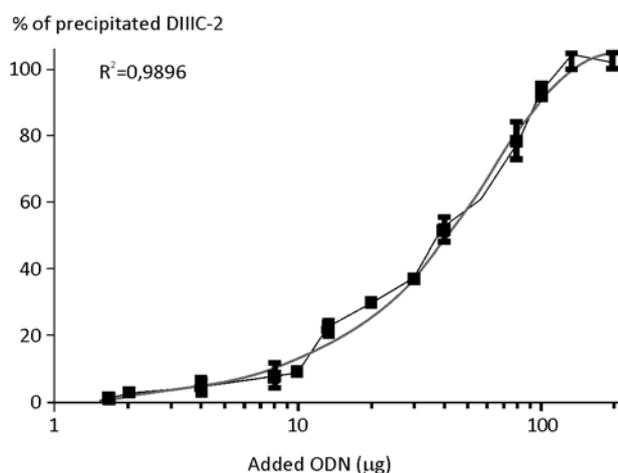
For the statistical analysis the GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) was used. The normal distribution of data was analyzed with D'Agostino Pearson's test and the variance homogeneity with the Bartlett's test. When normal or transformed data showed a normal distribution a parametric test was performed, otherwise data were analyzed with a non-parametric test. The parametric analysis of more than two groups was performed by a one-way analysis of variance, using the Tukey post-test. The non-parametric analysis of more than two groups was performed using Kruskal Wallis and Dunn Multiple Comparison test. Survival data from the protection assay were analyzed with the log rank test. In all cases \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## Results

### The relationship between the ODN quantity and the aggregation percentage exhibits a typical dose-response curve

The ODN 39M was used to define the curve between the quantities of ODN added to the aggregation reactions and the aggregated protein DIIC-2. Different quantities of ODN were incubated with DIIC-2. After the incubation period, the remaining protein was determined in the reaction supernatants and the precipitated DIIC-2 was calculated. As shown in Figure 1, a typical dose-response curve was detected ( $R^2=0.9896$ ). It is very important to mention that no ODN was detected in the supernatant of any of the samples tested.

### The quantity of ODN 39M used during the aggregation reaction of the protein DIIC-2 influences its immunogenicity in mice



**Fig. 1.** Percentage of protein DIIC-2 precipitated after the incubation with different quantities of the ODN 39M. The recombinant protein DIIC-2 (400 µg) was incubated with the ODN in TE buffer. The reactions were incubated for 30 minutes at 30°C and stored at 4°C for 4 hours. After the incubation period, the reactions were centrifuged 10 min at 12 000 g and the supernatant was collected. The amount of precipitated DIIC-2 was calculated by the difference between the initial DIIC-2 added to the reaction and the remaining DIIC-2 in the supernatant. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent assays.

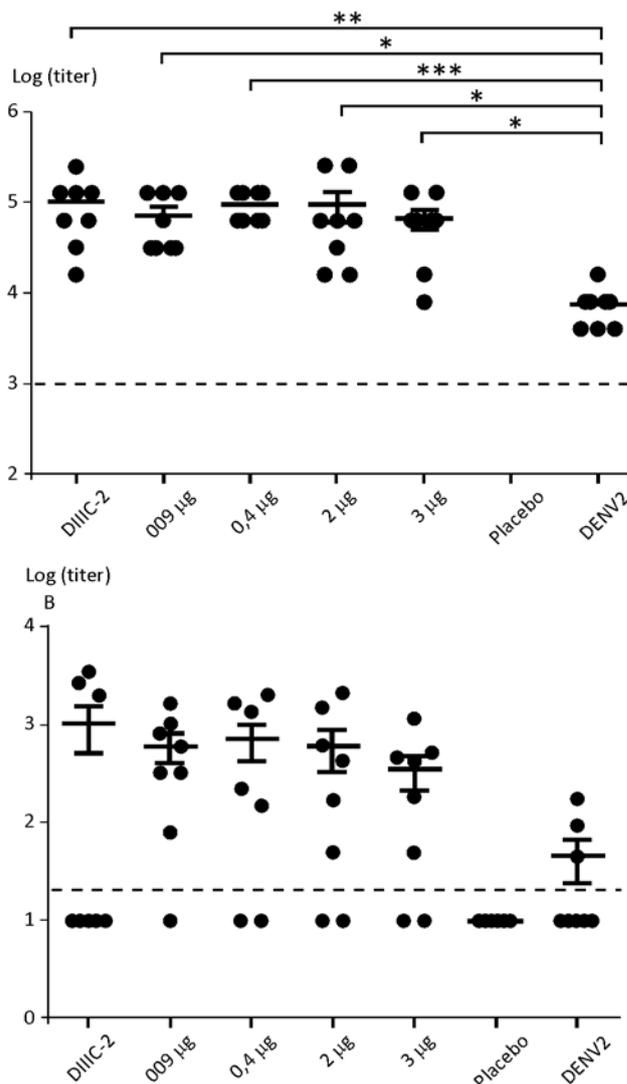
### Mice experiment #1

A first mice experiment was conducted to study the influence of the ODN 39M quantities used during the aggregation reaction, on the immunogenicity of DIIC-2. Three additional control groups were included in the study receiving: the non-aggregated protein, the Placebo formulation (negative control) and the infective DENV-2 (positive control).

## Characterization of the humoral immune response

All groups of animals immunized with the recombinant protein DIIC-2 developed high titers of antiviral antibodies without statistical differences among them ( $p > 0.05$ ), regardless the quantity of ODN 39M added in the formulation. In turn, all groups receiving the protein DIIC-2, whatever the condition, elicited antibody titers statistically higher than those detected in the placebo group and the positive control group. Similarly to the previous results, the positive control group induced low titers of antiviral antibodies, without statistical differences with respect to the placebo group ( $p > 0.05$ ) (Figure 2A).

The neutralizing capacity of the antibodies was assessed by PRNT. In agreement with the results from the ELISA aforementioned, all groups immunized with the recombinant protein



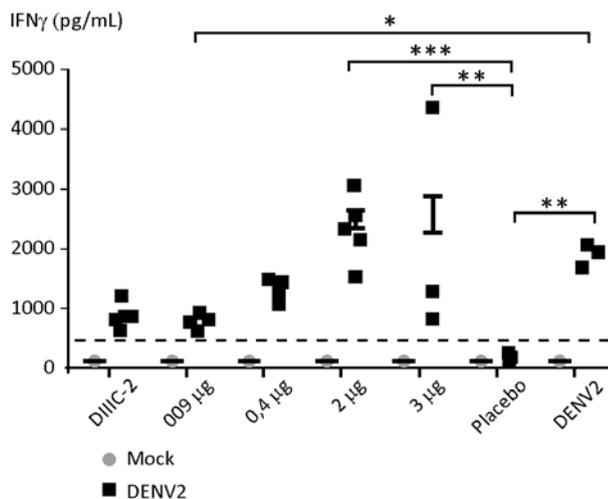
**Fig. 2.** Humoral immune response induced by the protein DIIC-2 aggregated with different quantities of the ODN 39M. As controls one group was immunized with the non-aggregated protein (DIIC-2), a second group received a placebo formulation (negative control) and the third one was inoculated with the infective DENV-2 (positive control). (A) IgG antibodies against DENV-2. Mice sera were collected 15 days after the third immunization and the antibody titers were measured by a capture ELISA. The dashed line indicates the cutoff (twice the mean titer of the placebo group). The statistical analysis was performed using Kruskal Wallis and Dunn Multiple Comparison test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  SD. N=8. (B) Neutralizing antibodies against DENV-2. Thirty days after the third immunization mice sera were collected and the neutralizing antibody titers were measured by a PRNT. Discontinuous line indicates the cutoff (twice the mean titer of the placebo group). The statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance, using the Tukey post-test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  SD. N=8. Results are representative of two independent experiments.

DIIC-2 induced detectable titers of neutralizing antibodies without statistically differences among them ( $p > 0.05$ ) (Figure 2B). Low titers were detected in sera from the DENV-2- immune animals. On the other hand, the percentage of responders was equal or more than 75% for the groups receiving the aggregated protein in the different conditions tested. In contrast, only the 37.5% of animals elicited neutralizing antibodies in the group immunized either with the non-aggregated protein or with the infective virus.

#### CMI measured by $IFN-\gamma$ secretion

The splenocytes from animals immunized with the aggregated protein using 2  $\mu\text{g}$  and 3  $\mu\text{g}$  of the ODN 39M as well as those from the positive control group were able to secrete  $IFN-\gamma$  upon *in vitro* stimulation with DENV-2, with statistical differences ( $p < 0.05$ ) with respect to the cytokine secretion in the placebo group. The levels of this cytokine for the groups immunized with the aggregated protein with 2  $\mu\text{g}$  and 3  $\mu\text{g}$  of the ODN and the group immunized with DENV-2 were 2323.8 pg/mL; 2260 pg/mL and 1952.6 pg/mL, respectively, without statistical differences among them ( $p > 0.05$ ). No significant secretion was detected for the non-aggregated protein as well as for the groups receiving 0.09  $\mu\text{g}$  and 0.4  $\mu\text{g}$  of ODN 39M. ( $p > 0.05$ ) (Figure 3).

#### The quantity of the 39M-DIIC2 influences its immunogenicity and protective capacity in mice



**Fig. 3.** Cellular immune response induced by the protein DIIC-2 aggregated with different quantities of the ODN 39M. As controls one group was immunized with the non-aggregated protein (DIIC-2), a second group received a placebo formulation (negative control) and the third one was inoculated with the infective DENV-2 (positive control). Culture supernatants from mock-treated or DENV-2-infected splenocytes from individual animals of all groups were tested 30 days after the third immunization. The concentration of  $IFN-\gamma$  was measured by ELISA. Dashed line indicates the cutoff (twice the mean concentration of the placebo). The statistical analysis was performed using Kruskal Wallis and Dunn Multiple Comparison test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM.  $N=5$ . Results are representative of two independent experiments.

#### Mice experiment #2

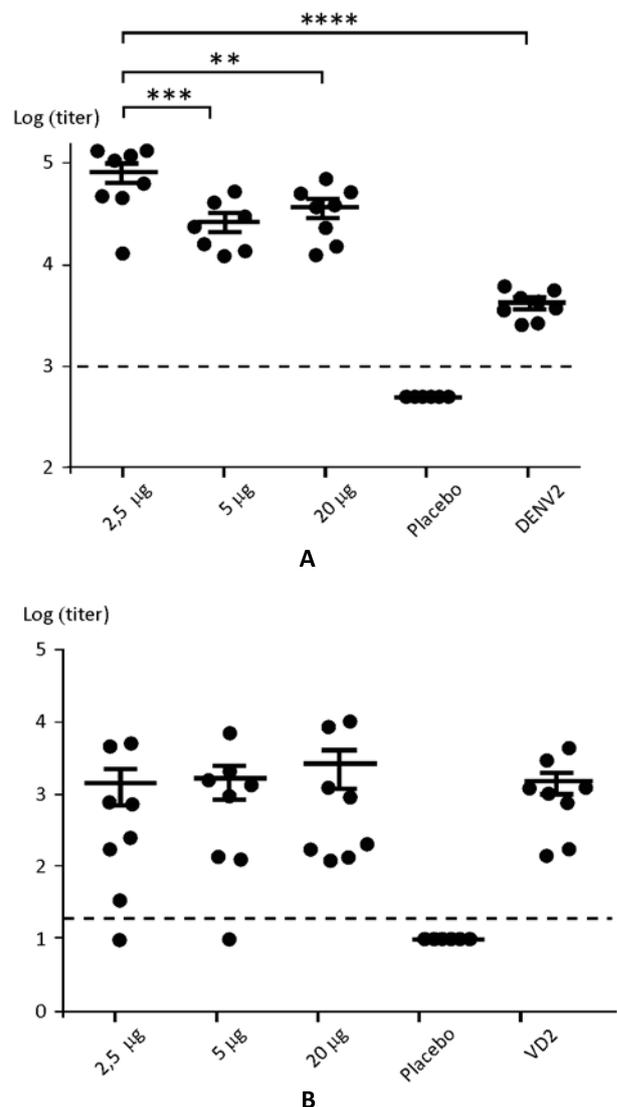
Based on the results from the first mice experiment the quantity of 2  $\mu\text{g}$  of ODN 39M was selected for the aggregation process of the protein DIIC-2. This formulation was named 39M-DIIC-2. A second mice experiment was conducted to study the influence of the quantity of the formulation 39M-DIIC-2, on the immunogenicity and protective capacity of the preparation adjuvanted in alum. Two additional control groups

were included in the study receiving the Placebo formulation (negative control) or the infective DENV-2 (positive control). The humoral and cellular immune responses were determined after the last dose.

#### Characterization of the humoral immune response

All groups of animals immunized with the formulation 39M-DIIC-2 induced titers of antiviral antibodies. The highest values were measured in sera from mice inoculated with the lowest quantity of the formulation: 2.5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ). In turn, the animals receiving 5  $\mu\text{g}$  and 20  $\mu\text{g}$  also exhibited titers statistically higher than those from the placebo group and positive control group ( $p < 0.05$ ) (Figure 4A)

The neutralizing capacity of the antibodies was assessed by PRNT. In contrast to the results from the ELISA, all groups immunized with the formulation 39M-DIIC-2 induced detectable



**Fig. 4.** Humoral immune response induced by different doses of the formulation 39M-DIIC-2. As controls one group group received a placebo formulation (negative control) and the other was inoculated with the infective DENV-2 (positive control). (A) IgG antibodies against DENV-2. Mice sera were collected 15 days after the third immunization and the antibody titers were measured by a capture ELISA. Dashed line indicates the cutoff (twice the mean titer of the placebo). (B) Neutralizing antibodies against DENV-2. Thirty days after the third immunization sera were collected and the neutralizing antibody titers were measured by a PRNT. Dashed line indicates the cutoff (twice the mean titer of the placebo). In both cases, the statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance, using the Tukey post-test (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).  $N=8$ . Results are representative of two independent experiments.

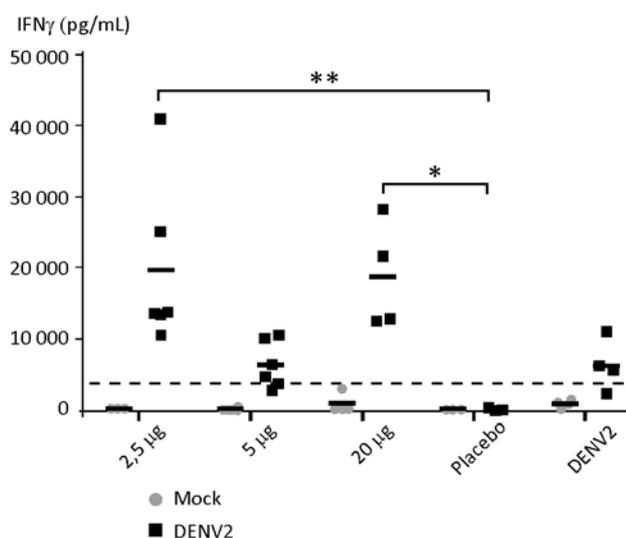
titers of neutralizing antibodies without statistically differences among them ( $p>0.05$ ) and similar to those detected in sera from the DENV-2- immune animals ( $p>0.05$ ) (Figure 4B).

#### CMI measured by IFN- $\gamma$ secretion

The splenocytes from animals immunized with 2.5  $\mu\text{g}$  and 20  $\mu\text{g}$  of the formulation 39M-DIIC-2 were able to secrete IFN- $\gamma$  upon *in vitro* stimulation with DENV-2 (19654 pg/mL and 18912 pg/mL, respectively) with statistical differences ( $p<0.05$ ) with respect to the cytokine secretion on the placebo group. Moreover, the IFN- $\gamma$  secretion levels for animals immunized with 5  $\mu\text{g}$  or the positive control did not exhibited statistical differences compared to the placebo group ( $p>0.05$ ) (Figure 5).

#### Protection assay

One month after the last dose, the protective capacity was assessed using the mouse encephalitis model. After the observa-



**Fig. 5.** Cellular immune response induced by different doses of the formulation 39M-DIIC-2. As controls one group group received a placebo formulation (negative control) and the other was inoculated with the infective DENV-2 (positive control). Culture supernatants from mock-treated or DENV-2-infected splenocytes from individual animals of all groups were tested 30 days after the third immunization. The concentration of IFN- was measured by ELISA. Dashed line indicates the cutoff (twice the mean concentration of the placebo). The statistical analysis was performed using Kruskal Wallis and Dunn Multiple Comparison test (\*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ). N=4-5. Results are representative of two independent experiments.

tion period upon challenge with DENV-2, the survival rate of the groups receiving 5  $\mu\text{g}$  and 20  $\mu\text{g}$  were 87.5% and 70% respectively, significantly higher than the percentage obtained in the negative control group ( $p<0.05$ ) and without statistical differences compared to the positive control group (100 %) ( $p>0.05$ ). On the contrary, only the 44.4% of mice receiving the low dose formulation (2.5  $\mu\text{g}$ ) survived upon challenge, without statistical differences compared to the negative control group ( $p>0.05$ ).

## Discussion

It is well known the influence of the dose used for vaccination on the immunogenicity of such a vaccine. Our group previously demonstrated that a vaccine candidate composed by the protein DIIC-2, aggregated with the ODN 39M and adjuvanted in alum, was able to induce protection in mice and monkeys against de homologous virus.<sup>13</sup> Nevertheless, a dose study to determine the

influence of the quantity of the ODN 39M or the mixture protein-ODN on the immunogenicity of the final formulation has not been carried out.

The first mice experiment of the present study was directed to select the best quantity of ODN required for the proper immunogenicity of the DIIC-2 protein. The different doses studied corresponded to different mass protein: ODN ratios during the *in vitro* aggregation reaction. Upon analysis of the curve quantity of ODN vs. percentage of DIIC-2 precipitation, a typical dose response behavior was detected. It was also interesting to note the lack of free ODN in the soluble fraction upon incubation with the protein, regardless the quantity added. Probably, the total quantity of the ODN assayed is required to aggregate the protein as insoluble forms, indicating that these quantities are limiting in all the reactions.

The first mice experiment reveals, in terms of humoral immune response, that quantity of ODN 39M did not influence the immunogenicity of the protein. In contrast, the CMI results indicated the superiority of the 2  $\mu\text{g}$  and 3  $\mu\text{g}$  of ODN for inducing the best IFN- $\gamma$  secretion with the final formulation. Consistently with our previous reports, the non-aggregated protein was not able to induce IFN- $\gamma$  secretion [11], indicating that ODN 39M is probably acting as adjuvant. The sequence of this ODN contains CpG motifs for stimulating cells of the immune systems in mice. One part of this ODN is a typical class A ODN, which are related on the stimulation of type I and II interferons.<sup>17-19</sup>

The second mice experiment was designed to study the effect of the quantity of the formulation 39M-DIIC-2, in their immunogenicity in mice. The mass ration protein: ODN 10:1 was kept since it was the best condition for inducing a proper immune response from the first mice experiment (2  $\mu\text{g}$  of the ODN 39M). Interestingly, the best immunogenicity profile, measured by ELISA against DENV-2 and IFN- $\gamma$  secretion, was induced with the lowest quantity of the vaccine preparation. These results demonstrate the critical role of the vaccine dose for inducing a potent immune response. Probably, 2.5  $\mu\text{g}$  is the best quantity to be properly presented to the mice immune system by intraperitoneal route. These results are in accordance to those reported by Clements et al., 2010.<sup>20</sup> They demonstrated in NHP that the lowest dose of a subunit vaccine (80% of the E protein of DENV-2 expressed in *Drosophila* S2 cells) using ISCOMATRIX as adjuvant, induced the best antiviral immune response.

Unexpectedly, in our work, the protection rates did not match with the immunogenicity profiles. The lowest percentage of protection was obtained in the group receiving 2.5  $\mu\text{g}$ , which developed the best immunogenicity. On the contrary, the best protection rates were obtained in the groups receiving the highest doses of the vaccine preparation. This contradiction should be carefully investigated, mainly based on the mouse animal used as well as the readout assayed: the survival. We have determined that the peak of viral load in the brain of infected mouse did not match with the maximal time of death thereby probably; the immune system is playing a role on the pathogenesis of the disease in the mouse encephalitis model. Additional experiments should be conducted to prove such a hypothesis and validate the survival or other readout as a proper marker for protection in the mouse encephalitis model for DENV. In addition, based on the present study we strongly recommend performing a non-human primate study with different vaccine doses, so as to define the best one to induce a proper protective immune response in an animal model closer to humans, using viremia as readout to measure protection.

## References

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504-7.
- Morrison D, Legg TJ, Billings CW, Forrat R, Yoksan S, Lang J. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. *J Infect Dis* 2010;201:370-7.
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012;380:1559-67.
- Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 1996;70:8765-72.
- Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 2001;75:7769-73.
- Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 2004;78:378-88.
- Gil L, Lopez C, Blanco A, Lazo L, Martin J, Valdes I, et al. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol* 2009;22:23-30.
- Zellweger RM, Eddy WE, Tang WW, Miller R, Shresta S. CD8+ T cells prevent antigen-induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. *J Immunol* 2014;193:4117-24.
- Weiskopf D, Sette A. T-Cell Immunity to Infection with Dengue Virus in Humans. *Front Immunol* 2014;5:93.
- Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E2046-E2053.
- Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, Lopez C, et al. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology*. 2009 Nov 25;394(2):249-58. doi: 10.1016/j.virol.2009.08.029.
- Valdes I, Gil L, Romero Y, Castro J, Puente P, Lao L, et al. The chimeric protein domain III-capsid of dengue virus serotype 2 (DEN-2) successfully boosts neutralizing antibodies generated in monkeys upon infection with DEN-2. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:455-9.
- Gil L, Marcos E, Izquierdo A, Lazo L, Valdes I, Ambala P, et al. The protein DIIIIC-2, aggregated with a specific oligodeoxynucleotide and adjuvanted in alum, protects mice and monkeys against DENV-2. *Immunol Cell Biol*. 2015 Jan;93(1):57-66. doi: 10.1038/icb.2014.63.
- Zust R, Toh YX, Valdes I, Cerny D, Heinrich J, Hermida L, et al. Type I IFN signals in macrophages and dendritic cells control dengue virus infection: implications for a new mouse model to test dengue vaccines. *J. Virol*. July 2014; 88(13): 7276-85.
- Marcos E, Gil L, Lazo L, Izquierdo A, Brown E, Suzarte E, et al. Purified and highly aggregated chimeric protein DIIIIC-2 induces a functional immune response in mice against dengue 2 virus. *Arch Virol* 2013;158:225-30.
- Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22:250-4.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-63.
- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004;34:251-62.
- Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 2001;166:2372-7.
- Clements DE, Collier BG, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 2010;28:2705-15.

Recibido: agosto de 2015.  
Aprobado: diciembre de 2015.



# Heberprot-P<sup>®</sup> 75



Heberprot-P es un medicamento novedoso y único prescrito para la terapia de la úlcera del pie diabético (UPD) basado en el factor de crecimiento humano recombinante (FCHrec.), mediante infiltración intralesional directamente en el sitio de la herida. La terapia con HEBERPROT-P llena el espacio de una necesidad médica no satisfecha para el tratamiento de las úlceras complejas del pie diabético. Ha beneficiado a más de 200 000 personas en el mundo y en Ecuador a cerca de 3 000 en el sector público en 10 hospitales.

## Seguridad de la vacuna anti-idiotípica 1E10 en pacientes con tumores de diversas localizaciones

### Security 1E10 anti-idiotypic vaccine in patients with tumors of different locations

Carmen Viada<sup>1</sup>, Martha Fors<sup>2</sup>, Elia Neninger<sup>3</sup>, Saily Alfonso<sup>4</sup>, Eduardo Santiesteban<sup>5</sup>, Ivis Mendoza<sup>2</sup>, Pedro Guerra<sup>2</sup>, Elena García<sup>2</sup>, Leslie Pérez<sup>1</sup>, Amparo Macías<sup>1</sup>, Maurenis Hernández<sup>1</sup>, Ana María Vázquez<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en Cuba y en el mundo. El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte y el cáncer colorrectal es la tercera causa de muerte. La vacuna anti-idiotípica 1E10 es un nuevo agente inmunoterapéutico, registrada para el cáncer de pulmón por el Centro de Inmunología Molecular (CIM). Se quiere evaluar la seguridad de esta vacuna en el tratamiento de diferentes localizaciones de cáncer. Para determinar la seguridad se evaluaron los eventos adversos ocurridos en seis ensayos clínicos (1 fase I en pulmón, 3 fases II en mama, colon y pulmón, 1 fase II-III y programa de uso expandido, ambos en pulmón). Se estudiaron 656 pacientes. Se midieron las variables demográficas, las características de la enfermedad y los eventos adversos. Los estudios fueron balanceados respecto a las características de base. Los eventos adversos más frecuentes fueron reacciones locales relacionadas con la vacuna anti-idiotípica 1E10, y reacciones sistémicas de intensidad ligera o moderada que no estuvieron relacionados con la administración de la vacuna en estudio. La vacuna anti-idiotípica 1E10 resulta segura por la baja frecuencia e intensidad de eventos adversos reportados.

**Palabras clave:** seguridad; vacuna anti-idiotípica; cáncer; mama; colon; pulmón de células pequeñas; pulmón de células no pequeñas.

#### ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death in Cuba and the world. Lung cancer is the leading cause of death, breast cancer is the second leading cause of death and colorectal cancer is the third leading cause of death. The 1E10 anti-idiotypic vaccine is a new immunotherapeutic agent, registered for lung cancer by the Center for Molecular Immunology (CIM). You want to evaluate the safety of this vaccine in the treatment of various cancer sites. To determine the safety adverse events occurred in six clinical trials (one stage I lung, 3 phase II in breast, colon and lung, 1 phase II-III and program expanded use, both in lung) were evaluated. 656 patients were studied. Demographic variables, the characteristics of the disease and adverse events were measured. The studies were balanced with respect to baseline characteristics. The most common adverse events were local reactions associated with 1E10 anti-idiotypic vaccine and systemic reactions of mild or moderate intensity that were not related to the administration of the vaccine under study. The 1E10 anti-idiotypic vaccine is safe for the low frequency and intensity of adverse events reported.

**Keywords:** security, anti-idiotypic, cancer, breast, colon, small cell lung, non-small cell lung vaccine.

### Introducción

En el año 2012 se detectaron alrededor de 14,1 millones de casos nuevos de cáncer. Ocurrieron 8,2 millones de muertes por cáncer.<sup>1</sup>

El cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer tanto en Cuba como en el mundo, donde se estimaron 1,8 millones de nuevos casos en el 2012 con 1,6 millones de muertes anuales. La enfermedad sigue siendo el cáncer más común en los hombres en todo el mundo (1,2 millones, el 16,7 % del total). En las mujeres, las tasas de incidencia

son generalmente más bajas y el patrón geográfico es un poco diferente, lo que refleja principalmente diferente exposición histórica al consumo de tabaco.<sup>1</sup> En Cuba la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón se ha incrementado durante los últimos años de 33,2 en el 2000 a 45,5 por 100 000 habitantes en el 2012. En el caso del cáncer de mama también ha aumentado considerablemente, de 18,2 en el 2000 a 27,1 en el año 2012.<sup>2</sup> En el 2010 se reportó 2 039 casos nuevos de cáncer colorrectal con 18,1 por cada 100 000 habitantes.<sup>3-4</sup>

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y el más frecuente entre las mujeres con un estimado de 1,67 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012

<sup>1</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Hospital Hermanos Ameijeiras, La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Hospital Celestino Hernández Robau, Villa Clara, Cuba.

<sup>5</sup> Hospital José Ramón López Tabranes, Matanzas, Cuba.

**Autor de correspondencia:** Carmen Viada. Centro de Inmunología Molecular. 216 y 15, Atabey, Playa, La Habana, Cuba PO Box 16040 CP 11600, Telef. (537) 271-7933 Ext. 3145, Fax: (537) 272-0644. Correo electrónico: carmen@cim.sld.cu

(25 % de todos los cánceres). Las tasas de incidencia varían casi cuatro veces a través de las regiones del mundo, con tasas que oscilan desde 27 por 100 000 en el África central y Asia oriental y de 96 en Europa Occidental. Se ubica como la quinta causa de muerte por cáncer en general y si bien es la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres en las regiones menos desarrolladas (14,3 % del total) ahora es la segunda causa de muerte por cáncer en las regiones más desarrolladas (15,4%) después del cáncer de pulmón.

Por su parte el cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en los hombres (746 000 casos, el 100 % del total) y la segunda en mujeres (614 000 casos, el 9,2% del total) en todo el mundo. Casi el 55 % de los casos se producen en las regiones más desarrolladas. La mortalidad es relativamente baja (8,5 % del total) con más muertes (52 %) en las regiones menos desarrolladas del mundo, lo que refleja una peor supervivencia en estas regiones.<sup>5-7</sup>

La vacuna anti-idiotípica 1E10 (Vaxira®, CIMAB S.A. La Habana) es un nuevo agente inmunoterapéutico, registrado en Cuba y en Argentina, desarrollado por el Centro de Inmunología Molecular (CIM), que se dedica a la investigación y producción de nuevos productos destinados al tratamiento de diversas enfermedades del sistema inmune entre ellas el cáncer. El principio activo es el anticuerpo monoclonal anti-idiotípico *racotumomab* adsorbido en gel de hidróxido de aluminio (HA) como adyuvante.

El HA mejora la producción de anticuerpos pero no es ni inmunogénico ni un hapteno. Se comporta como "depot" en el sitio de inyección, desde el cual el antígeno se libera lentamente

e induce la formación de granulomas que atraen células inmunocompetentes, tales como las células plasmáticas productoras de anticuerpos. El HA puede estimular directamente a los monocitos para producir citoquinas proinflamatorias que puedan activar las células T y posiblemente estimular respuestas de las células B.<sup>8,9</sup>

Este producto demostró beneficios interesantes en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (ensayo clínico terminado que permitió registro sanitario por la Agencia Reguladora Cubana). Fue investigado también en cáncer de mama, colon y pulmón de células pequeñas (tabla 1), y es además estudiado en algunos tumores pediátricos como neuroblastomas, retinoblastomas, sarcomas de Ewing y tumor de Wilms.<sup>10-14</sup>

*Racotumomab* es un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico que al ser administrado por vía intradérmica induce en los pacientes una potente respuesta inmune específica contra los glicolípidos glicolilados presentes en las células tumorales.<sup>9</sup>

Debido a sus favorables resultados, *racotumomab* fue considerado por la Revista MAbs como uno de los anticuerpos que debían ser observados durante el 2013.<sup>15</sup> Este producto se ha utilizado en diferentes localizaciones y en diversos tipos de población como son adultos hombres y mujeres y en estadios diferentes ya sea con enfermedad limitada o extendida.

La seguridad de un medicamento constituye un asunto de vital importancia, por lo que el reporte de eventos adversos en los ensayos clínicos se considera un eslabón primordial y deben ser

**Tabla 1.** Características de los ensayos clínicos considerados en este estudio

Código del Ensayo Clínico y Referencia del RPCEC Período de Ejecución	Diseño	Esquema de Vacunación de Vaxira (intradérmica) (con 15 dosis totales: 5 de la fase de inducción cada 14 días y 10 de mantenimiento cada 28 días) (con 5 mg/ml de Alúmina)	N		No. de las Referencias
			Vaxira IE10	Placebo/ Combinación	
<b>EC052</b> <b>RPCEC00000006</b> Ago/2001-Dic/2007	Fase II en cáncer de colon metastásico	Dosis de 2mg	40	No	No publicado
<b>EC071</b> <b>RPCEC00000010</b> Oct/2004-Dic/2007	Fase II en cáncer de pulmón de células pequeñas	Dosis de 2mg	36	36	30
<b>EC059</b> <b>RPCEC00000008</b> Mar/2003-Dic/2007	Fase II en cáncer de mama de alto riesgo	Escalado de Dosis: 0,5 mg, 1 mg y 2 mg	40	37	23 29
Sept/2004-Ene/2006	Fase I en cáncer de pulmón de células no pequeñas	Dosis de 2mg	71	0	21
<b>EC080</b> <b>RPCEC00000009</b> Dic/2006-Dic/2010	Fase II-III en cáncer de pulmón de células no pequeñas	Dosis de 2mg	89	87	33
<b>PUCE106</b> Dic/2006-Nov/2010	Programa de acceso expandido en cáncer de pulmón de células no pequeñas	Dosis de 2 mg	100	100	34 35

**Leyenda RPCEC (Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos):** Base de datos pública donde se pueden registrar los ensayos clínicos por los promotores.

recolectados sistemáticamente. El conocimiento sobre la probabilidad que tiene un determinado medicamento de producir eventos adversos (EA) concierne a promotores, médicos y pacientes para conocer los riesgos particulares que puede ofrecer una determinada terapia. El objetivo fue evaluar el perfil de seguridad de la vacuna anti-idiotípica 1E10 en el tratamiento de cáncer en diferentes localizaciones.

## Métodos

Para determinar la seguridad de este producto se evaluaron los eventos adversos ocurridos en seis ensayos clínicos promovidos por el CIM y ejecutados en diferentes sitios clínicos cubanos. Estos cubrieron diferentes localizaciones tumorales y fueron diseñados para estimar la eficacia y el perfil de seguridad de la vacuna anti-idiotípica 1E10. A partir de las bases de datos existentes para cada ensayo clínico incluido en la presente investigación, se estudiaron las variables demográficas: edad (años cumplidos) y sexo (masculino y femenino), las referentes a la enfermedad: estadio (I-II, III y IV), estado general (0, 1 y 2), tipo histológico de tumor (carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma células grandes y otros), tratamientos previos (quimioterapia o radioterapia), etapa de la enfermedad (limitada o extendida), localización de las metástasis (visceral y no visceral) y evaluación de la respuesta objetiva (Respuesta Completa, Respuesta Parcial, Enfermedad Estable y Progresión) según RECIT versión 1.2.<sup>16-18</sup> Referente a la seguridad: la frecuencia de eventos adversos.

Todos los ensayos fueron aprobados por los Comités de Ética de los sitios participantes y por la Autoridad Nacional Reguladora. Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito previa información sobre las características de ensayo. Se estudia-

ron un total de 656 pacientes incluidos en dichos estudios. Todos los sujetos reclutados recibieron al menos dos dosis del medicamento si fueron aleatorizados al grupo en estudio mientras que el resto recibió un placebo o una combinación de Vaxira® y nimotuzumab (anticuerpo monoclonal anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico).

En la tabla 1 se muestran los datos de seis ensayos clínicos en los que se ha probado la seguridad y eficacia del producto en distintas localizaciones de cáncer. En ella aparece un breve resumen del diseño, esquema de vacunación, tamaño de muestra y algunas referencias bibliográficas donde se muestran los principales resultados.

De estos estudios, uno se realizó en pulmón de células no pequeñas<sup>9-21</sup> (estudio de Fase I), tres fueron diseñados como estudios de Fase II (colon, mama<sup>9, 22-29</sup> y en pulmón de células pequeñas.<sup>30</sup> Se ejecutó además, un Fase II-III en pulmón de células no pequeñas<sup>31-33</sup> y uno de uso expandido (PUCE) en pulmón de células no pequeñas.<sup>34-35</sup>

La clasificación de los eventos adversos se realizó utilizando los criterios comunes de toxicidad del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos. Esta es la escala de toxicidad más empleada en los ensayos clínicos de Oncología.<sup>36</sup>

## Resultados

En uno de los ensayos (Fase II, pacientes con cáncer de mama de alto riesgo) los sujetos recibieron entre 0,5; 1 y 2 mg del principio activo debido a que se diseñó un estudio de escalado de dosis para seleccionar aquella de mejor desempeño, mientras que en el resto de los estudios, los pacientes recibieron 2 mg de dicho producto, pues esta dosis fue la que mejor resultados obtuvo en el estudio mencionado anteriormente.

**Tabla 2.** Datos demográficos de base y respuesta al tratamiento de los pacientes de cada estudio (A, B, C)

Variable	Colon (052)		Mama (059)		SCLC (071)		NSCLC (sin código)		NSCLC (080)		PUCE (106)	
	1E10 N=43	Placebo N=37	1E10 N=40	Placebo N=36	1E10 N=36	1E10 N=71	1E10 N=89	Placebo N=85	1E10 N=100	1E10+hr3 N=100		
<b>Edad</b>	63 (39-82)	56 (27-80)	57 (38-83)	59 (36-78)	59 (44-74)	61 (37-80)	62 (45-79)	62 (40-86)	63 (41-82)	62 (31-83)		
<b>Sexo</b>												
<b>Masculino</b>	24 (55,8 %)	NP	NP	22 (61,1 %)	23 (63,9 %)	42 (59 %)	67 (75,3 %)	49 (58,8 %)	65 (75,6 %)	ND		
<b>Femenino</b>	19 (44,2 %)	37 (100 %)	40 (100 %)	14 (38,9 %)	13 (36,1 %)	29 (41 %)	22 (24,7 %)	36 (41,2 %)	21 (24,4 %)	ND		
<b>Estadio</b>												
<b>I-II</b>	12 (27,9 %)	23 (62,2 %)	31 (79,6 %)	ND	ND	0 (%)	0 (%)	0 (%)	20 (26,7 %)	16 (24 %)		
<b>III</b>	9 (20,9 %)	10 (27,0 %)	5 (12,8 %)	ND	ND	34 (48 %)	55 (61,8 %)	44 (51,8 %)	33 (44 %)	31 (46 %)		
<b>IV</b>	20 (46,5 %)	4(10,8 %)	3(7,7 %)	ND	ND	37(52 %)	34 (38,2 %)	41(48,2 %)	22 (29,3 %)	20 (30 %)		
<b>ECOG</b>												
<b>0</b>	16 (37,2 %)	19 (54,3 %)	21 (56,8 %)	26 (50,9 %)	25 (49,1 %)	0 (%)	4 (47,2 %)	38 (44,7 %)	10 (13,2 %)	14 (20,9 %)		
<b>1</b>	22 (51,2 %)	16 (45,7 %)	16 (43,2 %)	10 (47,6 %)	11 (52,3 %)	61 (86 %)	45 (50,6 %)	43 (50,6 %)	49 (64,5 %)	36 (53,7 %)		
<b>2</b>	4 (9,3 %)	0(%)	0 (%)	0(%)	0 (%)	10(14 %)	2 (2,2 %)	4 (4,7 %)	16 (21,0 %)	15 (22,4 %)		
<b>3</b>	0(%)	0 (%)	0 (%)	0(%)	0 (%)	0(%)	0 (%)	0(%)	1 (1,3 %)	2 (3,0 %)		



NSCLC apareció en 53 pacientes la induración y en el PUCE en 20 pacientes se encontró ardor en el sitio de la inyección. Se puede observar que los eventos adversos más comunes son aquellos relacionados con la administración de la vacuna en el sitio de la inyección.

La información acerca de la intensidad o gravedad de los eventos adversos más frecuentes se puede encontrar en las publicaciones individuales de cada ensayo clínico. No se reportó en ninguno de los estudios eventos adversos graves relacionados con la utilización de la vacuna.

Las reacciones locales consistieron en dolor e induración en el sitio de aplicación de la vacuna, duraron entre uno y tres días, tras la cual se recuperaron completamente. Las reacciones sistémicas consistieron en fiebre (de aproximadamente dos horas de duración en la mayoría de los pacientes, mialgias, artralgias, prurito, cefalea y fatiga, y generalmente se resolvieron en menos de 48 horas.

No hubo diferencias en cuanto a tolerabilidad entre las dosis evaluadas. La mayoría de los eventos adversos fueron grado 1 y 2, ver tabla 4. No hubo evidencias de mayor severidad o frecuencia de eventos en sucesivas inyecciones. Se registraron dos episodios de eventos adversos de grado 3 atribuibles a la vacuna (0,5 %). Hasta el momento no se han reportado granulomas, nódulos ni descamación en el sitio de la inyección. Los eventos adversos no conllevaron a la interrupción de las administraciones ni tuvieron repercusión grave sobre la salud de los pacientes y según los síntomas fueron controlados satisfactoriamente con los fármacos indicados.

### Discusión

Los eventos adversos reportados con mayor frecuencia y relacionados con el preparado vacunal se refieren, fundamental-

**Tabla 3.** Eventos adversos más frecuentes de los pacientes de cada estudio según el número de reportes

	Colon Fase II	Mama Fase II	SCLC Fase II	NSCLC Fase I	NSCLC Fase II	PUCE	Total
Anorexia	19 (8,6 %)	22 (10,7 %)	12 (9,7 %)	0 (0,0 %)	64 (6,1 %)	17 (7,7 %)	21 (2,6 %)
Ardor en el sitio de inyección	0 (0,0 %)	146 (71,2 %)	21 (17,1 %)	0 (0,0 %)	428 (41,1 %)	127 (57,2 %)	158 (19,4 %)
Astenia	12 (5,5 %)	11 (5,4 %)	10 (8,1 %)	15 (5,7 %)	93 (8,9 %)	16 (7,2 %)	56 (6,9 %)
Cefalea	12 (5,5 %)	1 (0,5 %)	9 (7,3 %)	6 (2,2 %)	44 (4,2 %)	17 (7,7 %)	25 (3,1 %)
Dolor en el sitio de inyección	60 (27,3 %)	17 (8,3 %)	41 (33,3 %)	60 (22,9 %)	162 (15,6 %)	9 (4,1 %)	149 (18,3 %)
Eritema local	31 (14,1 %)	0 (0,0 %)	8 (6,5 %)	60 (22,9 %)	88 (8,5 %)	2 (0,9 %)	125 (15,3 %)
Fiebre	10 (4,5 %)	0 (0,0 %)	11 (8,9 %)	0 (0,0 %)	34 (3,3 %)	16 (7,2 %)	26 (3,2 %)
Hipersensibilidad	18 (8,2 %)	0 (0,0 %)	2 (1,6 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	18 (2,2 %)
Induración	32 (14,5 %)	0 (0,0 %)	5 (4,1 %)	71 (27,2 %)	49 (4,7 %)	1 (0,5 %)	128 (15,7 %)
Mialgias/ Artralgias	11 (5,0 %)	0 (0,0 %)	2 (1,6 %)	11 (4,2 %)	42 (4,0 %)	4 (1,9 %)	38 (4,7 %)
Prurito	15 (6,8 %)	8 (3,9 %)	2 (1,6 %)	38 (14,5 %)	37 (3,6 %)	13 (5,9 %)	71 (8,7 %)
Total	220 (100 %)	205 (100 %)	123 (100 %)	261 (32,0 %)	1041 (100 %)	222 (100 %)	815 (100 %)

**Tabla 4.** Eventos adversos más frecuentes de los pacientes de cada estudio según Intensidad

Intensidad	Colon Fase II	Mama Fase II	SCLC Fase II	NSCLC Fase I	NSCLC Fase II	PUCE	Total
Ligera	134 (60,9 %)	186 (90,7 %)	98 (81,6 %)	0 (0,0 %)	949 (91,2 %)	202 (91,0 %)	1569 (88,8 %)
Moderada	73 (33,2 %)	12 (5,9 %)	14 (11,7 %)	0 (0,0 %)	75 (7,2 %)	17 (7,7 %)	191 (10,6 %)
Severa	6 (2,7 %)	6 (2,9 %)	8 (6,7 %)	0 (0,0 %)	7 (0,7 %)	3 (1,4 %)	30 (1,6 %)
Muy Severa	1 (0,5 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (0,1 %)	0 (0,0 %)	2 (0,1 %)
Total	214 (97,3 %)	204 (99,5 %)	120 (97,5 %)	0 (0,0 %)	1032 (99,1 %)	222 (100 %)	1792 (100 %)

mente, a los observados en el área o sitio de la administración que habitualmente se producen posteriores a las administraciones inmunoterapéuticas, ver tabla 5.<sup>22, 40</sup>

El dolor es el evento adverso más frecuentemente reportado de conjunto con ardor en el sitio de inyección, eritema local, disnea, astenia, induración, cefalea, dolor óseo, mialgia, artralgia, anorexia, vómitos, náuseas, fiebre, tos, prurito, dolor abdominal e hipertensión arterial. Lo que concuerda con los resultados de este estudio.<sup>21</sup>

El ardor en el sitio de inyección está relacionado con la forma de administración propia del medicamento y con las características del adyuvante utilizado. El mismo es un ardor ligero, por lo que es tolerable y no limita que el paciente pueda continuar con el esquema de tratamiento.

En un estudio fase I realizado en Argentina en pacientes con cáncer de mama, una paciente tratada con 1 mg desarrolló una mácula dolorosa con una vesícula seguida de ulceración, luego de recibir la quinta dosis. Una biopsia de piel reveló vasculitis y la paciente fue retirada de la terapia. Otra paciente sufrió un síncope 10 días después de recibir la novena dosis de 2 mg. Este evento se consideró de improbable relación con la vacuna, pero la paciente interrumpió el tratamiento. Estos eventos no se presentaron en nuestra población estudiada.<sup>32</sup> La presencia de pápulas en el sitio de inoculación se observó en estudios preclínicos con ratas Cerp: SPRD de ambos sexos, procedentes de la División de Roedores Gonotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), tratadas con 0,1 mL de vacuna anti-idiotípica o 0,1 mL de gel de alúmina (grupo vehículo). Lo cual nos indica que posiblemente este evento esté relacionado con el gel de alúmina que también está presente como adyuvante de la vacuna.<sup>38-40</sup>

En el estudio preclínico de tolerancia local realizado con ratas albinas de la línea Wistar, provenientes del CENPALAB, de acuerdo con los estándares planteados por la Comunidad Europea, tratadas con 0,1 mL de la vacuna o 0,1 mL de gel de alúmina, en el sitio de administración se detectó la presencia de granulomas. Desde el punto de vista macroscópico no se observaron reacciones edematosas, eritematosas o de formación de escaras en el sitio de administración o regiones circundantes.<sup>41-45</sup>

De manera general la vacuna anti-idiotípica fue bien tolerada, tal y como lo describen otros estudios. Los eventos adversos relacionados con el producto en investigación se resumen, fundamentalmente, a los observados en el sitio de aplicación y a los llamados síntomas generales que habitualmente se producen con este tipo de terapia.

En la presente investigación, donde se han tenido en cuenta diversos ensayos clínicos en diferentes localizaciones, podemos confirmar que los eventos adversos más frecuentes relacionados con el uso de la vacuna *racotumomab* son locales, cuya intensidad es leve y moderada. No se detectaron eventos adversos graves

relacionados con la utilización del preparado vacunal, y con esto nos permite afirmar que el tratamiento con la misma es seguro.

Varias vacunas de nueva generación han demostrado excelente perfil de seguridad e inmunogenicidad, y la vacuna cubana que se evaluó en estos estudios no es una excepción.

Al analizar en su conjunto todos los estudios anteriormente citados se concluye que Vaxira fue bien tolerada. Los eventos adversos fueron reacciones locales y sistémicas relacionadas con la administración de la vacuna.

Se puede concluir que la vacuna bajo investigación resultó ser segura en los 656 pacientes evaluados. La mayoría de los eventos adversos relacionados con la vacuna fueron ligeros y moderados, lo que sustenta esta afirmación.

## Referencias bibliográficas

1. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponible en [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
2. Anuario Estadístico 2012. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de salud. ISSN 1561-4425, 2012. Disponible en: [http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario\\_2012.pdf](http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario_2012.pdf)
3. Montes de Oca E, Soler LL, Noa G, Agüero CM, González JL, Barreto E. 2012. Comportamiento del cáncer colorrectal esporádico en un hospital provincial. Rev cubana med [revista en la Internet]. Dic [citado 2014 Abr 16]; 51(4): 302-312. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232012000400004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232012000400004&lng=es).
4. Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR et al. 2012. Non-small Cell Lung Cancer. J Natl Compr Canc Netw;10:1236-1271
5. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, 55(2):74-108.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. 2008. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin, 58(2):71-96.
7. Ministerio de Salud Pública, Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario Estadístico de Salud 2010. La Habana: MINSAP; 2011. Disponible en: <http://files.sld.cu/bvscuba/files/2012/05/anuario-2011-e.pdf>
8. Li H, Nookala S, Re F. 2007. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce il-1beta and il-18 release. J Immunol, 178(8):5271-5276
9. Díaz A, Alfonso M, Alonso R, Saurez G, Troche M, Catala M, et al. 2003. Immune responses in breast cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking neugc-containing gangliosides. Clinical Immunology, 107(2):80-89
10. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. 1985. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminum hydroxide: Effect on antigen uptake and antigen presentation. Clin. Exp. Immunol, 61(1):143-151.

**Tabla 5.** Eventos Adversos más frecuentes de los pacientes de cada estudio según Causalidad

Causalidad	Colon Fase II	Mama Fase II	SCLC Fase II	NSCLC Fase I	NSCLC Fase II	PUCE	Total
Definitiva	135 (61,4 %)	127 (62,0 %)	63 (52,1 %)	0 (0,0 %)	660 (63,4 %)	128 (57,7 %)	1113 (62,2 %)
Muy Probable	14 (6,4 %)	1 (0,5 %)	13 (10,7 %)	0 (0,0 %)	22 (2,1 %)	3 (1,4 %)	53 (2,9 %)
Probable	15 (6,8 %)	28 (13,7 %)	2 (1,7 %)	0 (0,0 %)	121 (11,6 %)	52 (23,4 %)	218 (12,2 %)
Posible	20 (9,1 %)	7 (3,4 %)	11 (9,1 %)	0 (0,0 %)	79 (7,6 %)	0 (0,0 %)	117 (6,5 %)
No Relacionado	32 (14,5 %)	38 (18,5 %)	32 (26,4 %)	0 (0,0 %)	148 (14,2 %)	39 (17,6 %)	289 (16,1 %)
Total	216 (98,2 %)	201 (98,1 %)	121 (98,4 %)	0 (0,0 %)	1030 (98,9 %)	222 (100 %)	1790 (100 %)

11. Lindblad E. Aluminium adjuvants. In d. E. S. Stewart-tull (ed.). 1995. The theory and practical application of adjuvants. John wiley & sons ltd, new york, n.Y.
12. White RG, Coons AH, Connolly JM. 1955. Studies on antibody production. Iii. The alum granuloma. *J Exp Med*,102(1):73-82
13. Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. 2001. The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun*,69(2):1151-1159
14. Sokolovska A. HS, Hogen Esch H. 2007. Activation of dendritic cells and induction of cd4 (+) t cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*,25(23):4575-4585
15. Reichert JM. 2010. Antibodies to watch in 2010. *MAbs*. Jan-Feb; 2(1): 84-100.
16. Therasse P, Eisenhauer EA, Verweij J. 2006. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur J Cancer*, 42(8):1031-9.
17. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. 2009. New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45(2):228-47.
18. Bogaerts J, Ford R, Sargent D, Schwartz LH, Rubinstein L, Lacombe D et al. 2009. Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria. *Eur J Cancer*, 45(2):248-60.
19. Hernandez AM, Toledo D, Martinez D, Grinan T, Brito V, Macías A, et al. 2008. Characterization of the antibody response against neugcgm3 ganglioside elicited in non-small cell lung cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody. *J Immunol*, 181(9): 6625-6634.
20. Hernandez AM, Rodriguez N, Gonzalez JE, Reyes E, Rondon T, Grinan T, et al. 2011. Anti-neugcgm3 antibodies, actively elicited by idiotypic vaccination in non-small cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism. *J Immunol*, 186(6): 3735-3744.
21. Alfonso S, Diaz RM, de la Torre A, Santiesteban E, Aguirre F, Perez K, et al. 2007. 1e10 anti-idiotypic vaccine in non-small cell lung cancer: Experience in stage iiib/iv patients. *Cancer Biology & Therapy*,6(12):1847-1852.
22. Carr A, Rodriguez E, Arango MC, Camacho R, Osorio M, Gabri M, et al. 2003. Immunotherapy of Advanced Breast Cancer With a Heterophilic Ganglioside (NeuGcGM3) Cancer Vaccine. *J Clin Oncol*,21(6):1015-21.
23. Mulens V, de la Torre A, Marinello P, Rodriguez R, Cardoso J, Diaz R, et al. 2010. Immunogenicity and safety of a neugcgm3 based cancer vaccine: Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients. *Hum Vaccin*, 6(9): 736-744.
24. Lopez PH, Schnaar RL. 2009. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*, 19(5): 549-557.
25. Gomez DE, Vazquez AM, Alonso DF. 2012. Cancer antigen prioritization: A road map to work in defining vaccines against specific targets. A point of view. *Front Oncol*, 2(66): 1-2.
26. Fuentes D, Avellanet J, Garcia A, Iglesias N, Gabri MR, Alonso DF, et al. 2010. Combined therapeutic effect of a monoclonal anti-idiotypic tumor vaccine against neugc-containing gangliosides with chemotherapy in a breast carcinoma model. *Breast Cancer Res Treat*, 120(2): 379-389.
27. Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, et al. 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 56(1): 5165-5171
28. Oliva JP, Valdes Z, Casaco A, Pimentel G, Gonzalez J, Alvarez I, et al. 2006. Clinical evidences of gm3 (neugc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14f7 monoclonal antibody labelled with (99m)tc. *Breast Cancer Res Treat*, 96(2): 115-121.
29. Guthmann MD, Castro MA, Cinat G, Venier C, Koliren L, Bitton RJ, Vazquez AM, et al. 2006. Cellular and humoral immune response to N-glycolyl-GM3 elicited by prolonged immunotherapy with an anti-idiotypic vaccine in high-risk and metastatic breast cancer patients. *Journal of Immunotherapy*, 29(2):215-223.
30. Neningen E, Diaz RM, de la Torre A, Rives R, Diaz A, Saurez G, et al. 2007. Active immunotherapy with 1e10 anti-idiotypic vaccine in patients with small cell lung cancer: Report of a phase I trial. *Cancer Biology & Therapy*, 6(2): 145-150.
31. Macías A. 2012. Active specific immunotherapy with racotumomab in the treatment of advanced non-small cell lung cancer (nsclc). Presented at the 37th Annual ESMO Conference; Vienna, Austria; Abstract 1472. 2012
32. Fernández LE, Alonso DF, Gómez DE, Vázquez AM. 2003. Ganglioside-based vaccines and anti-idiotypic antibodies for active immunotherapy against cancer. *Expert Review of Vaccines*, 2(6): 817-823.
33. Alfonso S, Valdés A, Santiesteban ER, Flores YI, Areces F, Hernández M, et al. 2014. A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small-cell-lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, Manuscript Published OnlineFirst on May 1, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1674
34. Santiesteban E, Alfonso S, Neningen E, Acosta S, Pérez L, Macías A, et al. 2014. Racotumomab anti-idiotypic vaccine for patients with non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical Medicine*, 5, 844-850.
35. Pérez L, Estévez D, Gastón Y, Macías A, Viada CE. 2013. Seguridad del Racotumomab en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. *VacciMonitor*, 22(1):10-14.
36. Chen AP, Setser A, Anadkat MJ, Cotliar J, Olsen EA et al. 2012. Grading dermatologic adverse events of cancer treatments: The Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 4, 67(5): 1025-1039.
37. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Sandler A, Langer C, Sandler A, et al. 2002. A randomized phase III trial of four chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*, 346(19): 92-8.
38. Vazquez AM, Hernandez AM, Macías A, Montero E, Gomez DE, Alonso DF, et al. 2012. Racotumomab: An anti-idiotypic vaccine related to n-glycolyl-containing gangliosides - preclinical and clinical data. *Front Oncol*, 2(150): 1-6.
39. Vazquez AM, Alfonso M, Lanne B, Karlsson KA, Carr A, Barroso O, et al. 1995. Generation of a murine monoclonal antibody specific for n-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma*, 14(6): 551-556.
40. Moreno E, Lanne B, Vazquez AM, Kawashima I, Tai T, Fernandez LE, et al. 1998. Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for n-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology*, 8(7): 695-705.
41. Vazquez AM, Perez A, Hernandez AM, Macías A, Alfonso M, Bombino G, et al. 1998. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-neugc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma*, 17(6): 527-534.
42. Hernandez AM, Rodriguez M, Lopez-Requena A, Beausoleil I, Perez R, Vazquez AM. 2005. Generation of anti-neu-glycolyl-ganglioside antibodies by immunization with an anti-idiotypic monoclonal antibody: A self-versus non-self-matter. *Immunobiology*, 210(1): 11-21.
43. Diaz Y, Gonzalez A, Lopez A, Perez R, Vazquez AM, Montero E. 2009. Anti-ganglioside anti-idiotypic monoclonal antibody-based cancer vaccine induces apoptosis and antiangiogenic effect in a metastatic lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 58(7): 1117-1128.
44. Vazquez AM, Gabri MR, Hernandez AM, Alonso DF, Beausoleil I, Gomez DE, et al. 2000. Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to n-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep*, 7(4): 751-756.
45. Alfonso M, Diaz A, Hernandez AM, Perez A, Rodriguez E, Bitton R, et al. 2002. An anti-idiotypic vaccine elicits a specific response to n-glycolyl sialic acid residues of glycoconjugates in melanoma patients. *J Immunol*, 168(5): 2523-2529.

## INVESTIGACIÓN / RESEARCH

## Non-coding chloroplast regions analysis within the Orchidaceae family in Southern Ecuador

### Análisis de regiones del cloroplasto no codificante dentro de la familia Orchidaceae en el sur de Ecuador

Ludeña Bertha<sup>1,4</sup>, Cueva Augusta<sup>2</sup>, Riofrio Lorena<sup>2</sup>, Naranjo Carlos<sup>2</sup>, Bastidas Cristian<sup>2</sup>, Pintaud Jean-Christophe<sup>3</sup>, Suárez Juan-Pablo<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

Non-coding regions of the chloroplast genome offer interesting levels of nucleotide variation which are very useful for molecular genetics, population and phylogenetic analysis. The family Orchidaceae is represented by ca. 500 species in Southern Ecuador. In order to determine the genetic variability present in members of this family belonging to the genera *Cyrtochilum*, *Masdevallia*, *Epidendrum*, *Polystachya*, *Stelis* and *Zelenchoa*, we have analyzed four chloroplastic intergenic spacers: atpH - atpI, trnL - trnF, trnF - ndhJ and rps16 - trnQ. All these markers have shown high richness in simple sequence repeats (SSR), indels and substitutions. They resulted to be useful for species identification, phylogenetic analysis and population structure studies. Moreover the information provided by this analysis suggests that the endemic species *Masdevallia deformis* must be considered vulnerable and conservation strategies need to be adopted for its protection.

**Keywords:** Chloroplast intergenic spacers, conservation, genetic variability, Orchidaceae, Southern Ecuador.

#### RESUMEN

Regiones del genoma del cloroplasto no codificante ofrecen niveles interesantes de variación de nucleótidos que son muy útiles para la genética molecular, la población y el análisis filogenético. La familia Orchidaceae está representada por casi 500 especies en el sur de Ecuador. Con el fin de determinar la variabilidad genética presente en los miembros de esta familia pertenecientes a los géneros *Cyrtochilum*, *Masdevallia*, *Epidendrum*, *Polystachya*, *Stelis* y *Zelenchoa*, se han analizado cuatro espaciadores intergénicos cloroplásticos: atpH - atpI, trnL - TRNF, trnF - ndhJ y rps16 - trnQ. Todos estos marcadores han demostrado una alta riqueza en simples repeticiones de secuencia (SSR), indeles y sustituciones. Ellos resultaron ser útiles para la identificación de las especies, el análisis filogenético y los estudios de estructura de la población. Además la información proporcionada por este análisis sugiere que las especies endémicas *deformis* *Masdevallia* deben ser considerados vulnerables y deben adoptarse estrategias de conservación para su protección.

**Palabras clave:** espaciadores intergénicos, conservación, variabilidad genética, Orchidaceae, sur de Ecuador.

The Orchidaceae family encloses members with the most beautiful reproductive organs within Plantae kingdom. This monophyletic family is one of the largest with 765 genera and approximately 26500 species worldwide distributed (World Checklist of Selected Plant Families).

Orchids exhibit a large panoply of adaptation, ecological and morphological patterns which explain their capacity to colonize all land habitats. They constitute one of the most interesting biological models to assess evolutionary, phylogenetic and ecological studies.

Orchids represent around 25% of plants in Ecuador and they are the most important family of vascular plants in this country.<sup>1</sup> One third of species of this group is endemic. About 500 members of the Orchidaceae family have been described for the Southern Ecuadorian sierra.<sup>2</sup> In Ecuador the deforestation index is particularly high.<sup>3</sup> Epiphytic orchids are sensitive to this kind of anthropogenic activity.<sup>4</sup>

The southern province of Zamora-Chinchipec in Ecuador will be the focus of an intensive mining activity with harmful ecological consequences for its territory and neighbouring provinces. In this context a genetic approach to evaluate variability in the Orchi-

daceae family in Southern Ecuador, in order to establish levels of biological resistance to habitat modification, is a priority.

The chloroplast genome has demonstrated to be a source of important information for population and conservation genetics, phylogenetic inference and species identification (bar-coding) studies.<sup>5-7</sup>

Plastid genome shows a very conserved size, structure, gene content and arrangement of genes within terrestrial plants.<sup>7</sup> The most common structural pattern of this genome consist of two inverted repeats (IR) zones (25 Kb each one) separated by a long single copy (LSC) and a short single copy (SSC) regions respectively. The latter two accumulate mutations at a higher rate than the rest of the organelle genome.<sup>8</sup>

Seven orchids chloroplast genomes have been recently sequenced: *Phalaenopsis Aphrodite*,<sup>9</sup> *Oncidium sp.* Gower Ramsey,<sup>10</sup> *Rhizantella gardneri*,<sup>11</sup> *Neottia nidus-avis*,<sup>12</sup> *Erycina pusilla*,<sup>13</sup> *Corallorhiza striata*<sup>14</sup> *Cypripedium macranthos* and *Dendrobium officinale*.<sup>15</sup>

Chloroplastic regions with phylogenetical signal were identified around 1990's.<sup>16</sup> Moreover, Shaw has developed interesting

<sup>1</sup> Universidad Técnica Particular de Loja. Prometeo-Senescyt. Ecuador.

<sup>2</sup> Universidad Técnica Particular de Loja. San Cayetano Alto s/n Loja Ecuador.

<sup>3</sup> IRD. Institut de Recherche pour le Développement. Av. Agropolis 911. Montpellier France.

<sup>4</sup> Yachay-Tech University. School of Biology. Urququí. Ecuador.

markers for the non-coding region (2005.2007). Scarcelli et al.<sup>17</sup> reported a set of oligonucleotides useful to assess monocotyledons chloroplast variability.

In the present study we used four plastid markers: trnQ-rps16, atpH-atpI, trnL-ndhJ<sup>17</sup> and trnL (UAA)3'exon-trnF(GAA)<sup>16</sup> to study genetic diversity, phylogenetic relationships and chloroplast molecular evolution within members of the Orchidaceae family distributed in the South of Ecuador. The species analyzed were: *Cyrtorchilum myanthum*, *Epidendrum parviflorum*, *Epidendrum madsenii*, *Masdevallia deformis*, *Masdevallia gnoma*, *Stelis patinaria*, *Polystachya stenophylla* and *Zelenchoa onusta*.

With the exception of *C. myanthum* trnL-trnF studied region, this is the first report about variability within chloroplastic intergenic spacers in members of Orchidaceae family distributed in Southern Ecuador.

About one hundred individuals belonging to the species *C. myanthum*, *E. parviflorum*, *M. deformis*, *M. persicina*, *M. gnoma*, *S. patinaria*, *P. stenophylla* and *Z. onusta* were sampled in the provincias of Loja and Zamora Chinchipe and analyzed using the four intergenic spacers afore described.

Sequence editing, alignment, coding sequences translation and Megablast searches were performed with Geneious 4.7.5 software package (Biomatters Ltd). All sequences here obtained were deposited in GenBank. Phylograms based on SNP data were constructed using the BioNJ algorithm with the Jukes-Cantor distance, as implemented in Seaview version 4.<sup>18</sup>

Our results revealed that all chloroplastic loci here analyzed resulted rich in indels of varied size. An important sequence length variation among genera at all loci was also observed. Moreover, simple sequence repeats (SSRs), including mono-, di- and tetranucleotidic microsatellites and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) provided a significant source of polymorphism in these plastid regions.

The non-coding chloroplastic regions here studied revealed high variability at intra- and interspecific level, as well as marked structural differences among Orchidaceae genera. All analyzed sequences provided a high phylogenetical signal. These markers were very efficient to distinguish species, so they could be considered as potential barcodes. The scarce genetic variability detected for the species *Masdevallia deformis* (Figure .1) suggests that protective measures must be adopted in order to conserve this endemic component of the biodiversity in southern Ecuador.



Figure 1. *Masdevallia deformis*

#### Acknowledgements

This work is part of one of the publications resulting from the Prometeo's (SENESCYT-ECUADOR) fellowship accorded to Bertha Ludeña at Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) from February to August 2014.

#### References

- Jorgensen P, León-Yáñez S (eds). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Missouri Gard. 75: 1-1181. 1991
- León-Yáñez S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa Ulloa C, Navarrete H (eds.) Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador. 2da edición. Publicaciones del Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. 2011.
- MINISTRY OF ENVIRONMENT. 2010. Cuarto Informe Nacional Para el Convenio Sobre la Diversidad Biológica. Quito.
- Kartzinel T, Trapnel D, Glenn T. Microsatellite primers for the Neotropical Epiphyte *Epidendrum* (Orchidaceae). American Journal of Botany. 2012:e450-e452.
- Lockhart PJ, Howe ACJ, Barbrook, AWC, Larkum D, Penny D. Spectral analysis, systematic bias, and the evolution of chloroplasts. Mol. Biol. Evol 1999; 16:573-76.
- Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolf S, Hellwig FH. The chloroplast genome of *Nymphaea alba*: whole genome analyses and the problem of identifying the most basal angiosperm. Mol. Biol. Evol 2004. 21:1445-54.
- Shaw J, Lickey E, Schilling E. and Small R. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. American Journal of Botany 2007; 94(3) : 275-88.
- Perry AS, Wolfe KH. Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. Journal of Molecular Evolution 2002; 55: 501-08.
- Chang CC, Lin HC, Lin I, Chow TY, Chen HH, et al. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. Mol Biol Evol. 2006; 23: 279-91.
- Wu FH, Chan MT, Liao DC, Hsu CT, Lee YW, et al. Complete chloroplast genome of *Oncidium* Gower Ramsey and evaluation of molecular markers for identification and breeding in *Oncidium*. BMC Plant Biol 2010;10:68-80.
- Delannoy E, Fujii S, Colas des Francs-Small C, Brundrett M, Small I. Rampant gene loss in the underground orchid *Rhizanthella gardneri* highlights evolutionary constraints on plastid genomes. Mol Biol Evol 2011;28: 2077-86.
- Logacheva MD, Schelkunov MI, Penin AA. Sequencing and analysis of plastid genome in mycoheterotrophic orchid *Neottia nidus-avis*. Genome Biol Evol. 2011; 3: 1296-1303.
- Pan I-C, Liao D-C, Wu F-H, Daniell H, Singh ND, et al. Complete Chloroplast Genome Sequence of an Orchid Model Plant Candidate: *Erycina pusilla* Apply in Tropical *Oncidium* Breeding. PLoS ONE. 2012; 7(4): e34738. doi:10.1371/journal.pone.0034738
- Barrett CF, Davis JI. The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. Am J Bot 2012; 99: 1513-23.
- Luo J, Hou B-W, Niu Z-T, Liu W, Xue Q-Y, et al. Comparative Chloroplast Genomes of Photosynthetic Orchids: Insights into Evolution of Orchidaceae and development of molecular markers for Phylogenetic applications. PLoS ONE. 2014; 9(6):e99016. doi:10.1371/journal.pone.0099016.
- Taberlet P, Gielly L, Patou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology 1991; 17: 1105-09.
- Scarcelli N, Barnaud A, Eiserhardt W, Treier UA, Seveno M, et al. A Set of 100 Chloroplast DNA Primer Pairs to Study Population Genetics and Phylogeny in Monocotyledons. PLoS ONE 2011; 6(5): e19954. doi:10.1371/journal.pone.0019954
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution 2010; 27: 221-24.

Recibido: agosto de 2014.

Aprobado: diciembre de 2014.

## REVISIÓN / REVIEWS

## REVISIÓN

## Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos antiinfectivos

### Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents

Nelson Santiago Vispo<sup>1</sup>, Frank Camacho<sup>2</sup>, Maritza Pupo Antúnez<sup>3</sup>, Roberto Toledo<sup>4</sup>, Oliberto Sánchez Ramos<sup>5</sup>

## RESUMEN

**Introducción:** las causas de la resistencia a antibióticos son complejas. La tecnología de presentación sobre fagos filamentosos (TPFF) ha sido utilizada principalmente para obtener anticuerpos monoclonales (MAbs) y péptidos dirigidos contra dianas de cáncer o enfermedades inflamatorias. Hoy la tecnología se reconoce como una herramienta poderosa para seleccionar nuevos péptidos y anticuerpos que se pueden unir a una amplia gama de antígenos, que van desde células enteras, hasta proteínas y lípidos. En esta revisión, resaltamos artículos que utilizan esta tecnología para descubrir nuevos fármacos en contra de las enfermedades infecciosas, concentrándonos en péptidos y anticuerpos de acción antimicrobianos.

**Métodos:** se hizo una revisión de la literatura básica y actualizada sobre aspectos generales de la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos y la aplicación de la misma en la búsqueda de nuevos péptidos o anticuerpos de uso farmacéutico para combatir las enfermedades infecciosas transmitidas por bacterias y virus.

**Resultados:** se muestra información actualizada sobre los temas escogidos, con un enfoque orientador y práctico, dirigido a investigadores en el campo de la biología molecular con vistas a continuar profundizando y aplicando la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos, con énfasis especial en las aplicaciones que se han realizado en Cuba.

**Conclusiones:** los avances en los métodos de selección, producción, y las tecnologías de humanización muestran que la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos puede hacer una contribución significativa en la lucha contra patógenos clínicamente importantes.

**Palabras clave:** bacteriófagos; bibliotecas combinatorias; tecnología de presentación sobre fagos filamentosos; selección; enfermedades infecciosas; péptidos; anticuerpos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The causes of antibiotic resistance are complex. The phage display technology has been used mainly to produce monoclonal antibodies (MAbs) and peptides directed against cancer or inflammatory disease targets. Today, this technology is recognized as a powerful tool for selecting novel peptides and antibodies that can bind to a wide range of antigens, ranging from whole cells to proteins and lipid targets. In this review, we highlight research that exploits the phage display technology to discover new drugs against infectious diseases, with a focus on antimicrobial peptides and antibodies.

**Methods:** Basic and recent literature review was made, mainly focused on general aspects of phage display technology and the application in the search of new peptides or antibodies of pharmaceutical use to combat the infectious diseases transmitted by bacteria and virus.

**Results:** Updated information on the selected topics is shown, with a guiding and practical approach aimed at researchers in the field of molecular biology to continue deepening the technology with special emphasis in the applications that have been developed in Cuba.

**Conclusions:** Advances in methods of screening, manufacturing, and humanization technologies show that phage display technology can significantly contribute in the fight against clinically important pathogens.

**Keywords:** Bacteriophages, combinatorial libraries, phage display technology, bioengineering, infectious diseases, peptides, antibodies.

<sup>1</sup> Doctor en Ciencias. Investigador Titular. Prof. Titular. Investigador Prometeo del SENESCYT Ecuador, Ministerio de Industrias y Productividad. Zona 1 de desarrollo del Ecuador. Docente Universidad Yachay Tech. Ecuador.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias. Dirección de Investigaciones, Instituto Finlay. Centro de Investigación-Desarrollo-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Departamento de Microbiología y Virología. Laboratorio de Virología. Facultad de Biología. Universidad de la Habana Cuba.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

<sup>5</sup> Doctor en Ciencias. Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

**Autor de correspondencia:** Nelson Santiago Vispo. [nvispo@yachaytech.edu.ec](mailto:nvispo@yachaytech.edu.ec)

## Introducción

### Los bacteriófagos combatiendo enfermedades infecciosas

Fue el francés Félix D'Herelle quien en 1918 definió el término bacteriófago para referirse a “un microbio invisible antagonista de los bacilos de la disentería” que más tarde se definieron como virus que infectan bacterias.<sup>1</sup> Los bacteriófagos son la forma de vida más numerosa en la Tierra, diez veces más que las bacterias.<sup>2</sup> Pueden ser encontrados en todos los ambientes donde las bacterias crecen, desde el Sahara, los mares del Norte y las frías aguas de las Islas polares.<sup>3</sup> Son los responsables del 10 al 80 % de la mortalidad total de las bacterias en los ecosistemas acuáticos y son un importante factor limitante para las poblaciones bacterianas.<sup>4</sup> Son los virus más estudiados y los que más han contribuido al desarrollo de la Biología Molecular. Su acción lítica sobre bacterias patógenas permitió su uso como alternativa terapéutica frente a infecciones bacterianas. Su eficacia ha sido probada incluso contra microorganismos resistentes a antibióticos.<sup>5</sup>

Las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las principales causas de muerte a pesar de la disponibilidad de vacunas y antibióticos. En el interconectado mundo de hoy las enfermedades infectas contagiosas son capaces de propagarse rápidamente de forma global.<sup>6</sup> Nuevas enfermedades infecciosas han sido detectadas que emergen con una frecuencia anual superior a las década de los 70 y 90,<sup>7</sup> y otras han surgido recientemente con episodios letales como son el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS)<sup>8</sup> y la influenza aviar.<sup>9</sup> También tenemos el hecho de la diseminación de cepas resistentes a antibióticos como el *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE), *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem (NDM-1) y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a multidrogas (MDR). Una crisis en la salud pública mundial debido a las “Super bacterias” resistentes a antibióticos junto con un pobre desarrollo en las investigaciones de nuevos antimicrobianos es vaticinada por la OMS, declarando la búsqueda de nuevos fármacos para superar esta resistencia a los antibióticos, como una tarea prioritizada.<sup>10</sup>

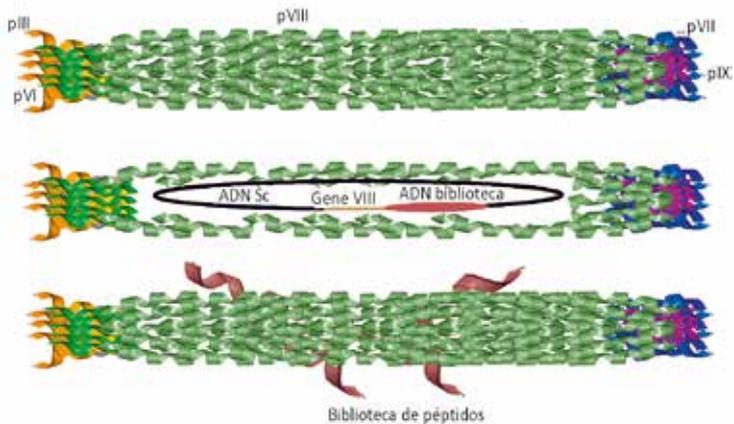
Con la secuenciación del genoma bacteriano en 1995 parecía que la aparición de cientos de nuevas moléculas blancas serían exploradas para la búsqueda de nuevos antimicrobianos como candidatos terapéuticos. Los antimicrobianos que han llegado al mercado en los últimos años son de amplio espectro y muy pocos específicos.<sup>11</sup> El éxito comercial de los mismos ha limitado el desarrollo de drogas patógenas específicas. Sin embargo las bacterias resistentes a antibióticos han hecho que se fueren nuevas estrategias patógenas específicas. Algunas de estas estrategias hacen necesario la selección a partir de grandes bibliotecas de compuestos químicos, productos naturales o biológicos por su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos específicos en ensayos con la bacteria entera. Comparando con las moléculas pequeñas sintéticas de origen químico, el descubrimiento de compuesto biofarmacéuticos anti infectivos ocupa un nuevo nicho comercial y de desarrollo clínico. Con las tecnologías recombinantes emergentes como la Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos (TPFF) (*phage display technology*) para el descubrimiento de anticuerpos monoclonales humanos (Mabs) y péptidos, se desarrollan nuevas oportunidades para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos específicos. Algunos péptidos y Mabs obtenidos de estas bibliotecas se encuentran actualmente en ensayos pre-clínicos y clínicos.<sup>12,13</sup> La TPFF está jugando un papel significativo en el descubrimiento de péptidos y anticuerpos que serían nuevos fármacos terapéuticos.<sup>14,15</sup> En este artículo resumiremos las dos últimas décadas de estudios para el desarrollo de antimicrobianos y la aplicación de esta tecnología en la industria para el desarrollo de nuevas drogas anti infectivas.

### Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos (TPFF)

Los fagos filamentosos son partículas virales flexibles tubulares de 900 nm de longitud y 6 nm de diámetro. Cada partícula viral está formada por un ADN de cadena única protegido por proteínas de la cápsida viral. La proteína mayoritaria de la cápsida es la pVIII, la cual puede encontrarse hasta en 2700 copias por partícula viral. El resto de las proteínas (presentes en tres a cinco copias por fago) cubren ambos extremos de la estructura tubular (pIII y pVI en un extremo y pVII y pIX en el otro) (Fig. 1).<sup>16</sup>

Los fagos filamentosos (cepas M13, f1 y fd) infectan bacterias de la cepa *Escherichia coli* a través de su unión (mediada por la proteína pIII) al receptor (pilus F de la bacteria) y su translocación hacia el citoplasma de la célula. En la replicación del genoma del fago participan proteínas virales y de la célula hospedera. Las nuevas partículas virales se ensamblan y se liberan al medio a través de la membrana bacteriana por un proceso lisogénico.<sup>17</sup>

La tecnología de presentación sobre fagos filamentosos constituye la plataforma de presentación de péptidos y proteínas más



**Fig. 1.** Representación esquemática de la estructura de los bacteriófagos filamentosos con las proteínas que conforman su cápsida, su ADN de simple cadena y el lugar de inserción de la biblioteca de péptidos. Los péptidos quedan expuestos en la cápsida del fago y en el interior la secuencia que codifica para este péptido.

poderosa en la actualidad.<sup>18</sup> Esta tecnología se basa en la modificación por ingeniería genética de las partículas de fagos, de forma tal que cada una de ellas puede incorporar a su material genético genes foráneos de interés, y exponer en su superficie las secuencias proteicas codificadas por ellos (fusionadas a proteínas de la cápsida viral).<sup>19</sup> De este modo existe una conexión entre fenotipo (molécula presentada) y genotipo (gen foráneo que codifica para esa molécula) en la misma partícula viral.<sup>20</sup>

### Ciclos de selección

La TPFF permite seleccionar un péptido o proteína a partir de una biblioteca empleando, un anticuerpo monoclonal (AcM), un suero policlonal, una proteína, un receptor, o incluso moléculas de origen lipídico o azúcares, mediante un procedimiento de purificación por afinidad denominado genéricamente selección o “bio-panning”. Debido a que la secuencia de ADN que codifica para el péptido o proteína se encuentra unida al genoma del fago vector, la secuencia aminoacídica del péptido expuesto puede ser deducida a partir de la secuencia nucleotídica de los pocos fagos seleccionados específicamente, que serán después clonados y amplificados.

Debido a estas propiedades, la tecnología de exposición funcional de péptidos y proteínas en fagos ha sido utilizada fundamentalmente para la caracterización de los residuos aminoacídicos que intervienen en las interacciones entre proteínas, la selección de mutantes de proteínas con una actividad incrementada

y la selección y modificación de anticuerpos a partir de grandes bibliotecas de regiones variables naturales y sintéticas.

Históricamente este método ha sido importante para el aislamiento de péptidos y anticuerpos contra blancos conocidos como proteínas, lípidos o pequeñas moléculas. Aunque los métodos estándares de la TPDF utiliza antígenos purificados, la selección utilizando células enteras es otra opción.<sup>21</sup> En las últimas décadas muchos grupos de investigadores utilizan células bacterianas o de mamíferos como blancos para identificar receptores específicos o péptidos y anticuerpos específicos de un tipo de célula.<sup>22,23, 24,25</sup>

Se han diseñado métodos de selección diversos para la obtención de fragmentos de anticuerpo contra determinada diana. En esencia la biblioteca de anticuerpos sobre fagos se enfrenta al antígeno en ciclos de selección repetidos que incluyen pasos de unión, lavados y elución de los fagos unidos. Se infectan bacterias con los fagos eluidos y se cultivan para producir los fragmentos de anticuerpo sobre la superficie de la partícula viral (Fig. 2).

Con el objetivo de incrementar la probabilidad de obtener fragmentos de anticuerpo diversos y de elevada afinidad, se recomienda realizar entre dos y tres ciclos de selección y utilizar técnicas de alto flujo (ELISA, microarray, inmunoensayos sobre membranas de nitrocelulosa) para el tamizaje y la identificación de los anticuerpos deseados.<sup>26</sup>

La mayor complejidad de las estrategias de selección se alcanza en los sistemas in vivo.<sup>27,28</sup> La mezcla de fagos de partida se inyecta directamente en animales y se colectan y se examinan los tejidos u órganos de interés. Se aíslan aquellos fagos portadores de fragmentos de anticuerpo que se acumularon selectivamente en la región blanco producto de las interacciones antígeno-anticuerpo. Este método de selección resulta de interés para la identificación de nuevos fármacos y sus mecanismos de circulación in vivo.

### Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos antiinfectivos

La TPDF se ha utilizado ampliamente para la identificación de péptidos y anticuerpos seleccionados contra patógenos como blancos, estos son subdivididos en dos categorías. i) blancos moleculares como las enzimas del proceso de replicación o división celular y factores de virulencia del patógeno en el hospedero. ii) células bacterianas enteras.

La selección utilizando células enteras, es una estrategia libre, que tiene la ventaja de reconocer estructuras en la superficie celular que no han sido considerado moléculas blancos cuando se asume una estrategia en base al genoma celular o que aún no han sido identificados si se comparan con blancos moleculares específicos. La utilización de patógenos vivos como blancos tiene la ventaja también que todas las estructuras con potencial farmacéutico en la superficie se seleccionan simultáneamente en su contexto nativo fisiológico, permitiendo la selección de potenciales antimicrobianos desde afuera de la célula. Los antígenos en la superficie celular del patógeno son posibles candidatos como blancos debido a que pueden interferir con la división celular de la bacteria,<sup>29</sup> la colonización o la virulencia.<sup>30</sup> Ambas estrategias han sido aplicadas ampliamente para desarrollar nuevas herramientas para el diagnóstico y tratamiento terapéutico de enfermedades infecciosas.

#### Bacterias grampositivas

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).<sup>31</sup> En la actualidad, la epidemia de TB se atribuye a dos factores principales: la infección con el VIH y su asociación con la TB activa, y el incremento de la resistencia de las cepas de *M. tuberculosis* a los fármacos anti-TB más efectivos.

Según estimados de la OMS, la tercera parte de la población mundial (aproximadamente 2 billones de personas) se encuentra

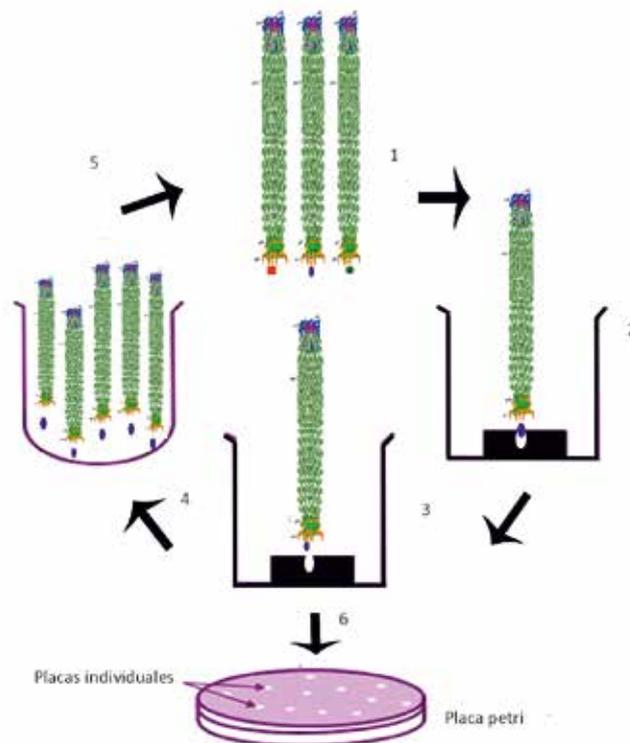
infectada por *M. tuberculosis* y solo en el año 2009 se reportaron 9,4 millones de nuevos casos de TB y 1,7 millones de muertes. La mayoría de estos casos ocurrieron en Asia (55 %) y África (30 %); y proporciones menores en las regiones Mediterránea del Este (7 %), Europea (4 %) y Las Américas (3 %).<sup>32</sup>

Hasta la fecha, la única vacuna anti-tuberculosa aprobada por la OMS y disponible para su uso en humanos es la cepa viva atenuada de *M. bovis* BCG. Se considera que la eficacia de la vacunación varía considerablemente de una población a otra. En niños recién nacidos protege contra las formas diseminadas de la enfermedad, mientras que no ofrece protección contra la TB pulmonar: la más frecuente y responsable de la diseminación.

Una de las más efectivas estrategias es la prevención de la transmisión y por lo tanto son necesarias nuevas herramientas para el diagnóstico rápido. Los ensayos utilizados actualmente para detectar células T respondedoras han mostrado diferentes problemas incluyendo la falta de respuesta a los antígenos utilizados debido a las variaciones provocadas por las infecciones concomitantes y a la ausencia del agente infeccioso.

Lípidos, glicolípidos y lipopéptidos derivados del Mtb son presentados a las células T por las moléculas de superficie celular no polimórficas CD1, expandiendo la posibilidad de blancos disponibles al sistema adaptativo inmune para el control de la infección.<sup>33, 34</sup>

La presentación de lípidos antigénicos a las Células T ha sido descrita en la TB, mediada por la presentación de lípidos asociados a las moléculas Cd1b.<sup>35</sup> Un nuevo antígeno lipídico que pertenece al grupo de los sulfoglicolípidos diacetilados (Ac2SGL) purificado del Mtb ha sido identificado.<sup>36</sup> Este Ac2SGL presentado a las moléculas Cd1b por Células T específicas está presente en los pacientes con TB y PPD-positivos y no en los PPD-negativos. Teniendo en cuenta que las moléculas de CD1b no son polimórficas, Ac2SGL es expresadas solamente por la micobacteria



**Fig. 2.** Método de selección o Biopanning. 1 Biblioteca de péptidos o anticuerpos. 2 Selección por afinidad contra una molécula blanco. 3 Elución de los fagos absorbidos. 4 Amplificación de los fagos seleccionados. 5. Repetición de los ciclos de selección. 6 Obtención de las placas individuales en una placa Petri con el fago seleccionado que expresa el ligando afín a la molécula blanco.

virulenta y este lípido no está sujeto a las mutaciones inducida por la presión selectiva del sistema inmune del hospedero: el uso del complejo CD1b:Ac2SGL como marcador universal de la infección por tuberculosis fue evaluado por un grupo del Instituto Finlay de La Habana utilizando un anticuerpo de cadena simple que reconoce el complejo CD1b:Ac2SGL de *M. tuberculosis* expuesto en la proteína III de los fagos filamentosos. Los resultados mostraron que la fusión a pIII fue exitosamente expuesta en la superficie del fago. Los estudios de reconocimiento por ELISA de los fagos e inmunohistoquímica muestran el reconocimiento del complejo CD1b:Ac2SGL en células humanas de pulmón de un paciente tuberculoso, comprobando la especificidad del mismo.<sup>37</sup>

Uno de los más importantes patógenos humanos y de las principales amenazas contra la salud humana es la bacteria *Staphylococcus aureus*. Un gran porcentaje de las infecciones por *S.aureus* es mediada por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA). Se han reportado, desde 1980, cepas de *S.aureus* resistentes al antibiótico vancomicina, considerado como la última alternativa.<sup>38</sup>

Yacoby y colaboradores utilizaron fagos específicos contra *S.aureus* para llevar el antibiótico hasta las células bacteriana, ellos seleccionaron una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos para elegir un fago específico contra *S.aureus* y también expresaron en el N terminal de la proteína III del fago el dominio ZZ que tiene una fuerte unión a las inmunoglobulinas, la droga fue conjugada al N terminal de la proteína VIII utilizando un enlace ester. La capacidad de carga del fago fue probado uniendo el mismo al antibiótico amino glicosidiconeomicina.<sup>39</sup> La droga es liberada del fago por hidrólisis del enlace ester en presencia del suero. La inhibición del crecimiento bacteriano fue incrementada significativamente incubando el fago transportador con la droga, comparándolo con la droga solo.

*Listeria monocytogenes* es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de la Listeriosis. Es uno de los patógenos causante de infecciones alimentarias más virulentos, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30 %, más alta que casi todas las restantes toxico infecciones alimentarias. Para evitar la infección es necesario detectar bajos niveles del patógeno en los alimentos.

Se utilizó la Tecnología de presentación sobre fagos para identificar un anticuerpo scFv que se puede unir a *Listeria monocytogenes* pero no a otras cepas de *Listeria*.<sup>40</sup> Tres años después de este hallazgo se desarrolló un sensor de Resonancia de superficie Plasmones (SPR) basado en el anticuerpo scFV.<sup>41</sup> El anticuerpo específico contra *L. monocytogenes* scFV expuesto en el fago fue inmovilizado en la superficie del sensor detectando hasta un límite de  $2 \times 10^6$  CFU/ml. El mecanismo de unión a la célula hospedera infectada por *Listeria monocytogenes* no está esclarecido, limitando el desarrollo de una estrategia preventiva o terapéutica apropiada. Utilizando la biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos expuesta sobre fagos filamentosos Gasanov y colaboradores demostraron que la invasión por *Listeria monocytogenes* mediada por la unión al receptor de Insulin-Like Growth Factor II (IGFIIIR) en las células de mamíferos.<sup>42</sup> Otros péptidos que se unen a *Listeria monocytogenes* fueron identificados seleccionando bibliotecas de 9 y 12 aminoácidos.<sup>43</sup> En el 2006 la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos aprobó el uso de bacteriófagos en ciertas carnes con el fin de acabar con la bacteria *Listeria monocytogenes*.

### Bacterias gramnegativas

La pared celular es esencial para la supervivencia de muchas bacterias y el antibiótico penicilina puede matar a las bacterias inhibiendo un paso en la síntesis del peptidoglicano (también denominado mureína), que está formado por cadenas de polisacárido entrecruzadas por péptidos inusuales que contienen aminoácidos D. En las bacterias grampositivas la pared celular contiene una capa gruesa de peptidoglicano además de ácidos teicoicos, que son polímeros de glicerol o ribitol fosfato. Los ácidos teicoicos se unen al peptidoglicano o a la membrana citoplasmática.

La mayoría de las bacterias tienen una pared celular gramnegativa y solamente Firmicutes y Actinobacteria (conocidas previamente como bacterias grampositivas de contenido GC bajo y bacterias Grampositivas de contenido GC alto, respectivamente) tienen paredes grampositivas. Estas diferencias en estructura pueden producir diferencias en la susceptibilidad antibiótica, por ejemplo, la vancomicina puede matar solamente a bacterias grampositivas y es ineficaz contra patógenos Gramnegativos, tales como *Haemophilus influenzae* o *Pseudomonas aeruginosa*. La síntesis de la pared celular de la bacteria involucra una serie de enzimas como MurA-G, transglicosilasas, y transeptidasas, la interrupción de cualquier parte de esta vía metabólica produce fallos en la síntesis de los peptidoglicanos y por consiguiente la lisis de la bacteria.<sup>44,45</sup> Se obtuvieron inhibidores de MurA seleccionando una biblioteca de 12 aminoácidos y otra de 7 aminoácidos constreñidas por dos cisteínas en los extremos del péptido y utilizando como molécula blanco la enzima MurA de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de inhibición de un 50 % (IC<sub>50</sub>) en el rango de los 200  $\mu$ M.<sup>46</sup> Las mismas bibliotecas fueron utilizadas para seleccionar contra la enzima MurC de *P. aeruginosa* como molécula blanco y se obtuvieron un péptido de 12 aminoácidos (DHRNPNYSWLKS) y otro cíclico de 7 aminoácidos (CQDTPYRNC) los cuales mostraron similar IC<sub>50</sub>s (1,5 mM y 0,9 mM, respectivamente) para la inhibición de MurC. Sin embargo los péptidos no se pudieron utilizar para desarrollar fármacos debido a su baja permeabilidad y a la susceptibilidad a proteasas del plasma. Se identificaron péptidos inhibidores de las enzimas MurE y MurF of *P. aeruginosa*.<sup>47,48</sup> Seleccionando contra la biblioteca de 12 aminoácidos, los dos péptidos (NHNMHRTT-QWPL y TMGFTAPRFPHY) inhiben las enzimas MurE y MurF a una IC<sub>50</sub>s de 500  $\mu$ M y 250  $\mu$ M, respectivamente. Se seleccionaron inhibidores contra las enzimas FtsA y FtsZ de *P. aeruginosa*, que intervienen en la división celular, utilizando una biblioteca de 12 aminoácidos y otra de 7 aminoácidos constreñidas por dos cisteínas en los extremos del péptido.<sup>49,50</sup> Se probaron además selecciones con estas bibliotecas y utilizando como blanco las células intactas de *P. aeruginosa*, los péptidos seleccionados se inmovilizaron en biosensores y fueron probados eficientemente en ensayos diagnósticos.<sup>51</sup>

La *Neisseria meningitidis*, también conocida por su nombre más simple de meningococo, es una bacteria diplocócica heterótrofa gramnegativa, de importancia en salud pública por su papel en la meningitis y otras formas de enfermedad meningocócica. Es la única forma conocida de meningitis bacteriana en causar epidemias. De los 13 serogrupos de esta bacteria, seis serogrupos (MenA, MenB, MenC, MenW, MenX y MenY) son los responsables de esta enfermedad a nivel mundial. Grupos del CIGB y del Instituto Finlay de La Habana han trabajado utilizando la Tecnología de presentación sobre fagos en busca de nuevos acercamientos diagnósticos y terapéuticos contra esta patología.

Se evaluó la inmunogenicidad y actividad funcional de anticuerpos obtenidos en ratón contra un péptido cíclico, unido por puentes disulfuros, correspondiente a la región variable 2 de la proteína exterior de membrana Por A de la cepa B385 (serosubtipo P1.15) de *Neisseria meningitidis* presentada en la superficie de los fagos filamentosos. El epitopo flanqueado por cisteínas o cisteínas y tres residuos de glicina, fue expresado fusionado a la proteína pVIII de los fagos filamentosos M13. La inmunización de ratones Balb/C con cada uno de los fagos generaron una respuesta específica de anticuerpos. El suero de los ratones inmunizados con el fago que exponía el péptido cíclico unido a las tres glicinas reconocía la proteína nativa mejor que el suero de ratones obtenidos solo el péptido cíclico. Solo los fagos que exponían el péptido cíclico con la cola de glicinas fue capaz de inducir una respuesta inmune con actividad bactericida, estos resultados indican la posibilidad de usar la tecnología de presentación sobre fagos de péptidos que requieran una adecuada conformación al ser presentados al sistema inmune para lograr una respuesta

inmune funcional.<sup>52</sup> Otra uso de la tecnología de fagos en esta patología fue para la obtención de un candidato vacunal contra el serogrupo B de la cepa meningococcal (MenB). El polisacárido capsular (MenB CPS) comparte epítomos cros reactivos y no cros reactivos contra los polisacáridos humanos. El anticuerpo mAb (13D9) que reconoce un epítomo único en MenB CPS fue utilizado como molécula blanco para seleccionar contra una biblioteca de péptidos de 15 aminoácidos fusionada al N terminal de la proteína pVIII de los fagos filamentosos. Se identificaron 4 péptidos capaces de unirse al anticuerpo mAb 13D9 en competencia con el MenB CPS. La inmunización de ratones contra estos péptidos expuestos en los fagos produjo anticuerpos IgG, principalmente IgG2a, es relevante que algunos de los péptidos identificados en este trabajo inducen niveles detectables de anticuerpos bactericida contra MenB y uno de ellos fue protector en un modelo in vivo. La tarea de diseñar vacunas contra el serogrupo B de la enfermedad meningococcica basado en antígenos no capsulares avanza lentamente y la posibilidad de utilizar péptidos miméticos para determinantes antigénicos no cros reactivos de MenB.CPS capaz de inducir actividad bactericida y anticuerpos protectivos es sin duda una posibilidad para el desarrollo de vacunas por sí mismo o en combinación con otros candidatos vacunales.<sup>53</sup>

*Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa que causa infecciones estomacales con inflamación crónica y está firmemente relacionada al desarrollo de úlceras y tumores en el sistema digestivo. La ureasa que es uno de los principales factores de virulencia producida por *H. pylori* ha sido utilizado como blanco para la selección de dos bibliotecas de péptidos fusionadas a pIII de 24 y 6 aminoácidos respectivamente.<sup>54</sup> De los péptidos seleccionados (TFLPQPRCSALLRYLSEGDGVIVPS y YDFYWW) dos se unen e inhiben la división de *H. pylori*. El mismo grupo de investigadores seleccionaron anticuerpos tipo ScFv de una biblioteca sobre fagos que inhiben la proteína ureasa de *H. pylori*.<sup>55</sup> Algunos de estos anticuerpos scFv pueden ser usados directamente en la terapéutica, otros fueron seleccionados utilizando como molécula blanco la bacteria completa.<sup>56</sup>

## Virus

Entre las formas de determinar los residuos aminoacídicos que intervienen en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, la síntesis de péptidos sintéticos, es una práctica habitual que cubre la secuencia del antígeno original. Nosotros analizamos primeramente con esta metodología los posibles sitios de unión del anticuerpo monoclonal CB-Hep1 al HbsAg (Antígeno de superficie de la Hepatitis B) y posteriormente abordamos esta práctica con la biblioteca de péptidos expuestos en la superficie de los fagos fusionada a la proteína VIII.

El AcM CB-Hep.1 reconoce específicamente el determinante común "a". Este determinante del HbsAg se localiza en un lazo que se extiende desde el residuo aminoacídico 101 al 159. Esta región es hidrofílica y extremadamente rica en cisteínas, conteniendo 8 residuos de los 14 que tiene el HbsAg.

El grupo de Folgori en 1994,<sup>57</sup> con sueros de individuos vacunados con el antígeno (HbsAg) y una biblioteca de péptidos de nueve aminoácidos, caracterizó la respuesta humoral de estos individuos. Se seleccionó un fagotopo de secuencia CKTC-TTPAQGN reconocido por el 80 % de las muestras de suero de individuos inmunizados con el HbsAg, lo que indica que el motivo C(K/R)TC es un epítomo inmunodominante. Debido a su importancia tanto en el desarrollo de vacunas, como en el establecimiento de sistemas de diagnóstico, el estudio de la estructura y composición epitópica del determinante "a" del HbsAg sigue constituyendo uno de los aspectos centrales de la investigación en estos campos. No menos importante es el hecho de haber comprobado que el AcM CB-Hep.1, actualmente en uso en el proceso de obtención de la vacuna recombinante Heberbiovac, reconoce de manera específica la región CKTC del determinante "a", crítica para el carácter "común" de éste, lo que garantiza que durante

la inmunopurificación se seleccionen aquellas moléculas de antígeno que expongan adecuadamente esta región, esencial para el desarrollo de una respuesta inmune protectora frente a diferentes subtipos virales.<sup>58</sup>

La Tecnología de presentación sobre fagos fue usada también para la búsqueda de anticuerpos y péptidos del alta afinidad contra el Virus de la hepatitis A (HAV)<sup>59</sup> y anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de la cápsida del Virus de la Hepatitis E.<sup>91</sup>

## TPFF y Dengue

El Dengue (VD) es la infección arboviral transmitida por mosquitos de mayor importancia en humanos en términos de morbi-mortalidad. Es causada por cualquiera de 4 sus cuatro serotipos (VD1, VD2, VD3 y VD4) resultando en un amplio rango de síntomas clínicos que puede ir desde la forma subclínica, la fiebre clásica de dengue (FD) y la fiebre hemorrágica de dengue (FHD). La infección por un serotipo confiere una protección duradera contra una re-infección por el mismo serotipo, pero esta es solo transiente contra una infección secundaria contra uno de los 3 serotipos restantes.<sup>60</sup> Los VD codifican y expresan 3 proteínas estructurales (capsida, C; pre membrana prM y envoltura E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, and 5)<sup>61</sup> de estas la proteína E es el blanco principal de la respuesta humoral en la infección por VD, aunque se ha reportado respuesta de células B a las proteínas prM y NS1.<sup>62</sup> Actualmente, la infección por dengue, representa una preocupación para las autoridades de salud a nivel global ya que dos quintos de la población mundial viven en regiones endemo/epidémicas.<sup>63,64</sup> Es por ello que el dengue ha sido también objeto de estudio en la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos (TPFF). Esta poderosa técnica a partir de bibliotecas combinatoriales altamente diversas, ya sea exponiendo péptidos o proteínas, permite distinguir moléculas únicas con selectiva afinidad por un blanco específico y presenta como ventaja primordial que el proceso de producción de los mismos, es muy rápido, barato y reproducible y permite disponer de un mayor y diverso número de moléculas.<sup>65</sup> En los últimos 15 años ha sido aplicada, preferentemente a enfermedades con alto potencial económico y a las llamadas enfermedades olvidadas contra las que actualmente no hay disponible moléculas antivirales o vacunas,<sup>66</sup> entre estas el dengue.

Debido a que hasta el momento, no existe una terapia específica para el dengue la prevención de la enfermedad está limitada al control del vector.<sup>63</sup> De esta forma, se hacen necesarios métodos de diagnóstico rápidos y específicos así como la obtención de una vacuna que representaría un importante avance en el control de la enfermedad. En ambos casos la identificación de epítomos de importancia biológica es esencial. Los epítomos inmunogénicos sobre las proteínas E y NS1 han sido los más documentados.<sup>67</sup> No obstante existen algunos reportes sobre la identificación de epítomos del VD sobre otras proteínas estructurales y no estructurales<sup>68,69</sup> como la proteínas prM, capsida y NS4a, los cuales son de gran importancia tanto en la patogénesis, el diagnóstico y el desarrollo de vacunas.<sup>70,71</sup>

Las características de un ensayo diagnóstico ideal para dengue depende del propósito para el cual el ensayo será usado, cualquiera que sea este, es indispensable el conocimiento de los epítomos inmunogénicos presentes en las proteínas virales. Los métodos directos (detección de antígeno) no son los realizados de rutina en el laboratorio y existen pocos juegos diagnósticos comerciales disponibles que hayan sido validados. No obstante, se han desarrollado nuevos ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunocromatográficos que tienen como blanco la proteína NS1 y que han revelado que pueden detectar altas concentraciones de este antígeno en muestras de pacientes con infección primaria o secundaria de dengue.<sup>72</sup> Los métodos indirectos (serológicos) son los más comúnmente usados para el diagnóstico de la infección

por dengue debido a que su uso es mucho más fácil comparado con las técnicas de aislamiento en cultivo celulares o detección de RNA.<sup>73</sup> Estos dependen de la detección de anticuerpos específicos a dengue en el suero del paciente. Con esta finalidad, existen varios juegos de diagnósticos comerciales (ELISA) en los cuales es utilizado como antígeno el virus completo obtenido ya sea por cultivos celulares o tejidos de animales infectados ambos sustratos altamente caros.<sup>74</sup> Estos formatos de prueba rápida, continúan siendo costosos y a pesar de que algunos han ofrecido buenos resultados, no se ha establecido ninguno como referencia. Además, pueden conducir a un diagnóstico errado debido a la reactividad cruzada entre los anticuerpos no dengue flavivirus específicos; lo cual hace necesaria la búsqueda de moléculas que replacen el antígeno viral completo con el fin de lograr mayor sensibilidad y especificidad.<sup>75</sup> En este sentido, una propuesta ha sido el uso de péptidos mimotópos obtenidos por TPDF, herramienta de gran utilidad para el diagnóstico pues ha constituido una fuente alternativa de antígenos en la identificación de anticuerpos anti-dengue.

La selección de péptidos que imitan epítomos del virus dengue han sido realizadas a través del mapeo de anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos al antígeno viral de interés o utilizando suero de individuos inmunes. Como fue referido anteriormente, las proteína de la envoltura (E) y la proteína no estructural 1 (NS1) han sido las más estudiadas debido a la importancia de estas en la inmunidad y en la etiopatogenia de la enfermedad.<sup>76,77</sup> La NS1 representa un interesante blanco para el diagnóstico debido a la presencia en la sangre de pacientes infectados principalmente desde el día 1 al 6 después del comienzo de los síntomas clínicos.<sup>78</sup> Por ello, los primeros mapeos de AcM a dengue con esta tecnología, fueron dirigidos hacia aquellos específicos contra la proteína NS1 del VD. A partir de estos estudios pudo ser identificada la secuencia HRYSWK que corresponde a los residuos 111-116 de esta proteína. Esta secuencia en un formato de péptidos múltiples demostró ser específica al serotipo 1 del VD capaz de detectar anticuerpos en muestras de pacientes confirmados con esta enfermedad y manifestó también la influencia ejercida de una histidina en la posición 111 en la actividad de unión al anticuerpo.<sup>79</sup> Un nuevo AcM específico contra la proteína NS1 del VD2 y la aplicación de la TPDF con una biblioteca de péptidos, hizo posible la identificación del epítomo serotipo específico para células B de este anticuerpo y permitió sintetizar un péptido con esta secuencia motivo, que resultó crucial en la unión al anticuerpo. Este péptido sintético identificó muestras de suero de ratones y conejos inmunizados contra dengue además de diferenciarlos de anticuerpos en ratones inmunizados con el virus de la encefalitis japonesa.<sup>80</sup> Varios de los péptidos identificados a partir de la proteína NS1 están en uso de forma exitosa como herramienta de diagnóstico para la detección de anticuerpos y prometen aplicaciones potenciales en el diagnóstico diferencial entre los flavivirus.

La TPDF exponiendo péptidos se ha utilizado también para investigar el posible uso de anticuerpos con dominios variables de cadenas pesadas (anticuerpos VHH o nanoanticuerpos) como herramienta diagnóstica alternativa al uso convencional de los AcM. Los nanoanticuerpos representan los fragmentos más pequeños de la unión antígeno-anticuerpo pudiendo instaurar, dadas sus propiedades, las bases para una nueva generación de anticuerpos. Fátima y colaboradores en 2014 generaron nanoanticuerpos contra una proteína recombinante de NS1 del VD2 a partir de una biblioteca no-inmune de llama (*Lama glama*) y determinaron los epítomos de unión de los anticuerpos VHH usando la TPDF de una librería de péptidos. Estos nanoanticuerpos y AcM convencionales a esta proteína fueron usados y comparados en la preparación de un juego diagnóstico inmunocromatográfico rápido. Ambos anticuerpos reconocieron la misma región de la proteína NS1, sin embargo los anticuerpos VHH mostraron mayor sensibilidad y especificidad demostrando que estos anticuerpos son una opción en el desarrollo de pruebas

diagnósticas para la infección por VD.<sup>81</sup>

La TPDF exponiendo anticuerpos ha sido también utilizada, Cabezas y colaboradores a partir de una biblioteca universal de anticuerpos humanos de individuos no inmunizados, obtuvieron un total de 9 anticuerpos anti-dengue. Siete de ellos fueron altamente específicos para tres de los serotipos seleccionados (VD1, 3 y 4). Uno de los fragmentos (seleccionado contra DEN-3) mostró reactividad cruzada contra DEN-1, mientras que otro (seleccionado contra DEN-2) reaccionó con los cuatro serotipos. Estos patrones de especificidad y reactividad cruzada fueron confirmados con un panel más amplio de cepas de los cuatro serotipos. Se logró la selección de fragmentos de anticuerpo contra epítomos virales comunes dentro de cada serotipo reconocido, lo que apoya su aplicación en el diagnóstico y/o la tipificación del virus dengue.

La caracterización de seis de los fragmentos de anticuerpo como moléculas solubles (fuera del contexto de los fagos) confirmó sus propiedades de reconocimiento y demostró que reconocen al virus a concentraciones muy bajas (en el orden de los nmol/l), lo que indica una alta afinidad de las interacciones. El análisis de las secuencias de las regiones variables de estos primeros anticuerpos humanos seleccionados contra el virus dengue muestra una gran diversidad en su origen inmunogenético y aporta información valiosa sobre el repertorio de inmunoglobulinas humanas involucradas en el reconocimiento de este patógeno.<sup>82,83</sup>

Humira o Adalimumab fue el primer anticuerpo terapéutico derivado de una biblioteca sobre fagos filamentosos que fue aprobado por la FDA (EUA) en el año 2002 para uso en humanos. Este anticuerpo tiene la capacidad de neutralizar al TNF- $\alpha$  y se utiliza actualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide.<sup>84</sup> Existen además otros anticuerpos o fragmentos derivados de ellos en estudios preclínicos y algunos más avanzados en diferentes fases de ensayos clínicos. Se caracterizan por su capacidad de neutralizar citocinas, receptores de moléculas angiogénicas o patógenos completos, útiles para la terapia de diversos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes, alérgicas e infecciosas.<sup>85,86</sup>

De la misma forma se ha demostrado que los fragmentos de anticuerpo aislados a través de la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos pueden ser empleados en todas las técnicas en las que normalmente se utilizan los AcMs derivados de la tecnología de hibridomas (ELISAs, western blot, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo, entre otras).<sup>87,88</sup> Debido a que los fragmentos de anticuerpo pueden ser fácilmente modificados genéticamente, algunos de ellos se han fusionado a moléculas marcadoras.<sup>89,90</sup> De esta forma se convierten en proteínas bifuncionales, mantienen su capacidad de unión al antígeno diana y a la vez presentan actividad de marcaje.

## Conclusiones

Al igual que otras metodologías de selección de afinidad, la Tecnología de presentación sobre fagos tiene sus limitantes. Para la obtención de nuevos agentes antimicrobianos, incluyendo péptidos y anticuerpos este método obtiene con altas probabilidades moléculas de relativa baja afinidad y muchas de ellas carecen del principal atributo de ser antimicrobiano o necesitan modificaciones para mejorar su actividad. Por ejemplo, la reconstrucción de anticuerpos de tipo ScFv o Fabs en anticuerpos enteros utilizando células de mamífero, además péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana generalmente muestran uniones no específicas y toxicidad en células de mamíferos.<sup>91</sup> lo que limita la aplicación de la tecnología para seleccionar desde bibliotecas de péptidos.

Para la mayoría de las indicaciones, una droga debe unirse a su molécula blanco con un grado razonable de afinidad. Aproximadamente el 60 % de los proyectos para la búsqueda de nuevas moléculas fallan debido a que la molécula blanco no es la ideal o la seleccionada no posee una potencia real de unión al blanco por ende de producir una función biológica.<sup>92</sup> La Tecnología de presentación sobre fagos tiene como ventaja que facilita los pro-

cesos de selección, para obtener sobre la molécula blanco aquellas de mayor afinidad y mejor potencia (afinidad en el orden de nM) y que permita el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.<sup>93</sup>

En las moléculas de origen químico obtenido de la selección de compuestos sintéticos se obtienen normalmente afinidades con el blanco de un 50 % de la concentración efectiva ( $EC_{50}$ )/ $IC_{50}$  en el rango de 1 a 5  $\mu$ M. Se requieren muchos ciclos de diseño de estructura, síntesis y ensayos de actividad para obtener moléculas con una potencia en el orden de los nM, esta tarea toma frecuentemente muchos años y se necesita de un gran equipo de trabajo dedicado a la síntesis y la química médica. Además para muchos blancos no es fácil lograr con pequeños compuestos químicos sintéticos una actividad biológica elevada debido a que poseen una superficie de contacto limitada. En contraste el poder de las técnicas de ADN recombinante utilizando diversos ciclos de selección por afinidad y maduración con la tecnología de fagos permite obtener moléculas potentes en poco tiempo. A modo de comentario, es de notar que moléculas de alta afinidad y potencia no se obtiene rutinariamente de las bibliotecas de péptidos y anticuerpos disponibles comercialmente.<sup>94</sup> Mucho conocimiento de la molécula blanco y experiencia en las técnicas de biología molecular son requeridas para el diseño de una biblioteca de péptidos o anticuerpos. Además algunos péptidos o MABs funcionan solo cuando forman parte integral de la proteína de la cápsida del fago u otro andamiaje proteico y no aislado solo en solución.<sup>95,96,16,97</sup>

Es cierto que la mayoría de los antibióticos y antivirales en el mercado farmacéutico actual o en desarrollo derivan de pequeñas moléculas químicas sintéticas, sin embargo hay una serie de proyectos en tránsito de posibles candidatos a drogas a partir de bibliotecas sobre fagos. Hasta hace poco, la tecnología de exposición en fagos fue utilizada para producir MABs de aplicación principalmente en las áreas de cáncer y las enfermedades inflamatorias. Las disputas de patentes impidieron su amplio uso y contribuyeron a la escasez de candidatos de posibles anticuerpos en la clínica durante los años 1990. La selección de bibliotecas naives o inmunizadas utilizando fagos permiten potencialmente desarrollar anticuerpos enteros contra agentes infecciosos y tienen el potencial para el desarrollo de agentes anti infecciosos de aquellos patógenos refractarios a los actuales tratamientos. Las tasas de transición exitosa de fase I (prueba de seguridad) a fase II (prueba de eficacia) para todos los MABs terapéuticos derivados de ratones transgénicos y de bibliotecas de fagos son 87 % y 94 %, respectivamente. Desde la fase II hasta la aprobación por la FDA, los índices de éxito son 52 % y 37 %, respectivamente.<sup>15</sup> Por lo tanto los MABs obtenidos de bibliotecas de fagos tienen comparativamente una tasa de 35 % de pasaje exitoso de fase I hasta su lanzamiento, comparado con un promedio en la industria de un 12 % para un candidato de droga química sintética. Dado la escasez de nuevos agentes antimicrobianos y antivirales en el desarrollo clínico o preclínico, creemos que es imperativo considerar que las bibliotecas de péptidos o anticuerpos expuestos en el cápsida de los fagos filamentosos son una alternativa valiosa para de forma rápida obtener nuevas moléculas de uso clínico.

## Agradecimientos

Agradecemos de manera especial al Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador por su patrocinio en este trabajo

## Referencias bibliográficas

- D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comp Rend Acad Sci Paris* 1917; 165: 373-5.
- Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30:118-128.
- Sävström CH, Lisle J, Anesio AM, Priscu JC, Laybourn-Parry J. Bacteriophage in polar inland waters. *Extremophiles*. 2008; 12:167-175.
- Weinbauer M. Ecology of procaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28:127-181.
- Vispo NS, Puchades Y. Bacteriofagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biocología Aplicada*. 2001; vol 18. 135-147.
- Headley CM. Bad bugs, bad bugs—whatchagonna do when they come for you? *Nephrol. Nurs. J*. 2011;38:433-34.
- Satcher D. Emerging infections: getting ahead of the curve. *Emerg. Infect. Dis*.1995;1:1-6.
- Rota PA. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*.2003;300:1394-99.
- Lyall J, Irvine RM, Sherman A, McKinley TJ, Núñez A, Purdie A, Outtrim L, Brown IH, Rolleston-Smith G, Sang H, Tiley L. Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens. *Science*.2011;331:223-226.
- WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. World Health Organization, Geneva, Switzerland: <http://www.who.int/drugresistance/guidance/en/index.html>.2001.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*.2009; 48:1-12.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent. Eur. J. Biol*.2007; 2:1-33.
- Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol*.2005;23:1073-78.
- Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov*.2012;11:37-51.
- Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov*.2010;9:767-774.
- Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem Rev*. 1997 Apr 1;97(2):391-410.
- Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002 Sep;35(6):425-45.
- Santiago Vispo N. *Combinatoria Molecular*. Elfos Scientiae. La Habana; 2004.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985 Jun 14;228(4705):1315-7.
- Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*. 1998 Jun;4(1):1-20.
- Watters JM, Telleman P, Junghans RP. An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology*1997;3:21-9.
- Bishop-Hurley SL, Rea PJ, Mc Sweeney CS. Phage-displayed peptides selected for binding to *Campylobacter jejuni* are antimicrobial. *Protein Eng. Des. Sel*.2010;23:751-7.
- Cao J, Zhao P, Miao XH, Zhao LJ, Xue LJ, Qi ZT. Phage display selection on whole cells yields a small peptide specific for HCV receptor human CD81. *Cell. Res*.2003; 13:473-9.
- Pereira S, Maruyama H, Siegel D, Van Belle P, Elder D, Curtis P, Herlyn D. A model system for detection and isolation of a tumor cell surface antigen using antibody phage display. *J. Immunol. Methods* 1997; 203:11-24.
- Szardenings MI, Törnroth S, Mutulis F, Muceniece R, Keinänen K, Kuusinen A, Wikberg JE. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1. *J. Biol. Chem*.1997;272:27943-48.
- Buckler DR, Park A, Viswanathan M, Hoet RM, Ladner RC. Screening isolates from antibody phage display libraries. *Drug Discov Today*. 2008 Apr; 13(7-8):318-24.
- Johns M, George AJ, Ritter MA. In vivo selection of scFv from phage display libraries. *J Immunol Methods*. 2000 May 26; 239(1-2):137-51.
- Robert R, Jacobin-Valat MJ, Daret D, Miraux S, Nurden AT, Franconi JM, et al. Identification of human scFv targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display. *J Biol Chem*. 2006 Dec 29; 281(52):40135-43.
- Lock RL, Harry EJ. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2008; 7:324-338.
- Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov*.2010; 9:117-28.
- Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:93-129.
- WHO. Global tuberculosis report 2012.
- Gilleron M, Stenger S, Mazorra Z, Wittke F, Mariotti S, Bohmer G, et al. Diacylated sulfolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2004; 199:649-59.
- Tourne S, Maitre B, Collmann A, Layre E, Mariotti S, Signorino-Gelo F, et al. Cutting-edge: a naturally occurring mutation in CD1e impairs lipid antigen presentation. *J Immunol* 2008; 180:3642-6.
- Mori L, De Libero G. Presentation of lipid antigen to T cells. *Immunol Lett* 2008; 117:1-8.
- Richman SA, Kranz DM. Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors. *Biomol Eng* 2007; 24:361-73.
- Camacho F, Huggett J, Kim L, Infante JF, Lepore M, Perez V, et al. Phage display of functional  $\alpha\beta$  single-chain T-cell receptor molecules specific for CD1b:Ac<sub>2</sub>SGL complexes from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells. *BMC Immunology* 2013; 14 (Suppl 1):S2.
- Weigel LM. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003; 302:1569-1571.
- Yacoby I, Bar H, Benhar I. Targeted drug-carrying bacteriophages as antibacterial nanomedicines. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007; 51:2156-2163.
- Paoli GC, Chen CY, Brewster JD. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol. Methods*. 2004; 289:147-155.

- 41 Nanduri V, Bhunia AK, Tu SI, Paoli GC, Brewster JD. SPR biosensor for the detection of *L. monocytogenes* using phage-displayed antibody. *Biosens. Bioelectron.* 2007; 23:248–252.
- 42 Gasanov U, Koina C, Beagley KW, Aitken RJ, Hansbro PM. Identification of the insulin-like growth factor II receptor as a novel receptor for binding and invasion by *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 2006; 74:566–577.
- 43 Carnazza S, Gioffre G, Felici F, Guglielmino S. Recombinant phage probes for *Listeria monocytogenes*. *J. Phys. Condens. Matter* 2007; 19:395011
- 44 Scheffers D-J, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69:585–607.
- 45 Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptide glycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10:123–136.
- 46 Molina-Lopez J, Sanschagrin F, Levesque RC. A peptide inhibitor of MurA UDP-N-acetyl glucosamine enolpyruvyl transferase: the first committed step in peptidoglycan biosynthesis. *Peptides.* 2006; 27:3115–21.
- 47 Paradis-Bleau C, et al. Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF. *BMC Biochem.* 2008; 9:33.
- 48 Paradis-Bleau C. *Pseudomonas aeruginosa* MurE amide ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor. *Biochem. J.* 2009; 421:263–72.
- 49 Paradis-Bleau C, Sanschagrin F, Levesque RC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* FtsZ peptide inhibitors as a tool for development of novel antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 54:278–80.
- 50 Paradis-Bleau C, Sanschagrin F, Levesque RC. Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng. Des. Sel.* 2005; 18:85–91.
- 51 Carnazza S, Foti C, Gioffre G, Felici F, Guglielmino S. Specific and selective probes for *Pseudomonas aeruginosa* from phage-displayed random peptide libraries. *Biosens. Bioelectron.* 2008; 23:1137–44.
- 52 Menéndez T, De Haz I, Delgado M, Garay H, Martín A, Vispo NS. Immunisation with phage-displayed variable region 2 from meningococcal PorA outer membrane protein induces bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis*. *Immunol Lett.* 2001 Oct 1; 78(3):143–8.
- 53 Menéndez T, Vispo NS, Cruz-Leal Y, Coizeau E, Garay H, Reyes O, et al. Identification and characterization of phage-displayed peptide mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B capsular polysaccharide. *Int J Med Microbiol.* 2011 Jan; 301(1):16–25.
- 54 Houimel M, Mach JB, Corthesy-Theulaz I, Corthesy B, Fisch I. New inhibitors of *Helicobacter pylori* urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries. *Eur. J. Biochem.* 1999; 262:774–80.
- 55 Houimel M. Selection of human single chain Fv antibody fragments binding and inhibiting *Helicobacter pylori* urease. *Tumour Biol.* 2001; 22:36–44.
- 56 Sabarth N. Identification of *Helicobacter pylori* surface proteins by selective proteinase K digestion and antibody phage display. *J. Microbiol. Methods* 2005; 62:345–49.
- 57 Folgori A, Tafi R, Felici F, Galfre G, Cortese R, Monaci P, Nicosi A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptides libraries and human sera. *EMBO J.* 1994; 13: 2236–43.
- 58 Felici F, Puchades Y, Fernández de Cossío ME, Vispo NS. Exposición multivalente con la utilización de la proteína pVIII de la cápsida de los fagos filamentosos. *Combinatoria Molecular. N Santiago Vispo (Editor) Elfos Scientiae.* 2004.
- 59 Larralde OG. Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. *J. Virol. Methods* 2007; 140:49–58.
- 60 Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development. *Vaccine* 2011;(29):7276–84.
- 61 Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.* En: Knipe DM HP, eds. *Fields Virology.* London: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:991–1042.
- 62 Moreland NJ, Susanto P, Lim E, Tay MYF, Rajamanonmani R, Hanson BJ et al. Phage Display Approaches for the Isolation of Monoclonal Antibodies Against Dengue Virus Envelope Domain III from Human and Mouse Derived Libraries. *Int. J. Mol. Sci.* 2012(13):2618–35.
- 63 Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of Clinical Virology* 2003;(27):1–13.
- 64 Hughes HR, Crill WD, Chang GJ. Manipulation of immune dominant dengue virus E protein epitopes reduces potential antibody-dependent enhancement. *Virology Journal* 2012;(9):1151.
- 65 Mehta J VDB, Devriese L, Rouah-Martin E, Bekaert K, Somers K, Somers V, et al. The Use of Phages and Aptamers as Alternatives to Antibodies in Medical and Food Diagnostics. En: Komorowska M. A and Olsztyńska-Janus S, eds. *Biomedical Engineering: Trends, Research and Technologies InTech.* 2011.
- 66 Castel G, Chtéoui M, Heyd B and Tordo N. Phage Display of Combinatorial Peptide Libraries: Application to Antiviral Research. *Molecules* 2011;(16): 3499–518.
- 67 Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, et al. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):977–82.
- 68 Rathakrishnan A and Sekaran SD. New development in the diagnosis of dengue infections. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2012:1–14.
- 69 Menéndez F. Fagos filamentosos como inmunógenos. *Combinatoria Molecular.* Vispo NS, ed. La Habana: Elfos Scientiae, 2004:253.
- 70 Luo YY, Feng JJ, Zhou JM, Yu ZZ, Fang DY, Yan HJ et al. Identification of a novel infection-enhancing epitope on dengue prM using a dengue cross-reacting monoclonal antibody. *BMC Microbiology* 2013;(13):194.
- 71 AnandaRao R, Swaminathan S, Khanna N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. *Virus Research.* 2005;(112):60–68.
- 72 Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; (13): 1185–89.
- 73 Peeling WR, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S30–8.
- 74 Ananda Rao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana AM, Khanna N. Recombinant multi-epitope protein for early detection of dengue infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;(13):59–67.
- 75 Ananda Rao R, Swaminathan S, Khanna N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. *Virus Research* 2005;(112):60–68.
- 76 Lai CY, Tsai WY, Lin SR. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol* 2008;82:6631–6643
- 77 Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165–8.
- 78 Alcon S, Talarmin A, Debryne M, Falconar A, Deubel V, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 2002;(40):376–81.
- 79 Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, et al. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):977–82.
- 80 Sun EC, Ma JN, Liu NH, Yang T, Zhao J, et al. Identification of two linear B-cell epitopes from West Nile virus NS1 by screening a phage displayed random peptide library. *BMC Microbiology* 2011;11:160.
- 81 Fatima A, Wang H, Kang K, Xia L, Wang Y, Ye W et al. Development of VHH Antibodies against Dengue Virus Type 2 NS1 and Comparison with Monoclonal Antibodies for Use in Immunological Diagnosis. *PLOS ONE* 2014;9(4):e95263.
- 82 Cabezas S, Rojas G, Pavon A, Alvarez M, Pupo M, Guillen G, et al. Selection of phage-displayed human antibody fragments on Dengue virus particles captured by a monoclonal antibody: application to the four serotypes. *J Virol Methods.* 2008;147(2):235–43.
- 83 Cabezas S, Rojas G, Pavon A, Bernardo L, Castellanos Y, Alvarez M, et al. Phage-displayed antibody fragments recognizing dengue 3 and dengue 4 viruses as tools for viral serotyping in sera from infected individuals. *Arch Virol.* 2009;154(7):1035–45.
- 84 Machold KP, Smolen JS. Adalimumab - a new TNF-alpha antibody for treatment of inflammatory joint disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2003 Apr;3(2):351–60.
- 85 Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng.* 2007 Jun;24(2):201–15.
- 86 Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol.* 2005 Sep;23(9):1105–16.
- 87 Petrenko VA, Sorokulova IB. Detection of biological threats. A challenge for directed molecular evolution. *J Microbiol Methods.* 2004 Aug;58(2):147–68.
- 88 Petrenko VA, Vodyanov VJ. Phage display for detection of biological threat agents. *J Microbiol Methods.* 2003 May;53(2):253–62.
- 89 Morino K, Katsumi H, Akahori Y, Iba Y, Shinohara M, Ukai Y, et al. Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *J Immunol Methods.* 2001 Nov 1;257(1–2):175–84.
- 90 Muller BH, Chevrier D, Boulain JC, Guesdon JL. Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J Immunol Methods.* 1999 Jul 30;227(1–2):177–85.
- 91 Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet.* 1997; 349:418–422.
- 92 Cheng AC, et al. Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25:71–75.
- 93 Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1:727–30.
- 94 Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Antibody technology in proteomics. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2008; 7:275–282.
- 95 Vispo NS, Felici F, Castagnoli L, Cesareni G. Hybrid Rop-pIII proteins for the display of constrained peptides on filamentous phage capsids. *Ann Biol. Clin.* 1993; 50: 917–22.
- 96 Pini A. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:2665–72.
- 97 Rojas G, Pupo A, Del Rosario Aleman M, Vispo NS. Preferential selection of Cys-constrained peptide from a random phage-displayed library by anti-glucitolysine antibodies. *J PeptSci.* 2008 Nov; 14(11):1216–21.

## REVISIÓN

## Enfermedad Renal Poliquística

### Polycystic Kidney Disease

Pedro Cena Rivero<sup>1</sup>, Rocío Elizabeth Castillo Andrade<sup>2</sup>, Silvia Marcela Baquero<sup>3</sup>, Viviana Margarita Espirel<sup>4</sup>**RESUMEN**

La Enfermedad Renal Poliquística es una enfermedad genética conocida por sus siglas en Inglés PKD (Polycystic Kidney Disease) y se caracteriza por la aparición progresiva de lesiones quísticas en los riñones que sustituyen el parénquima renal, causando el deterioro de su función hasta el estadio 5. La PKD constituye una de las causas de Enfermedad Renal Crónica bajo tratamiento sustitutivo renal (TSR). Tiene dos patrones de herencia: el patrón autosómico dominante y el patrón autosómico recesivo. La forma dominante es más común pero menos grave que la forma recesiva. Se conoce que es causada por la mutación en varios loci del genoma humano. La forma autosómica dominante puede ser causada por mutaciones en dos genes diferentes (PKD1 y PKD2), a diferencia de la forma autosómica recesiva que sólo tiene un gen causal (PKHD1). En la actualidad la comunidad científica dirige esfuerzos hacia el conocimiento más profundo de la fisiopatología de esta entidad que permita desarrollar alternativas terapéuticas encaminadas a retrasar la aparición de los quistes o la progresión de los que ya están instaurados. El objetivo es sistematizar el conocimiento científico disponible acerca de la Enfermedad Renal Poliquística, y brindar un medio de consulta actualizada sobre las características clínicas y terapéuticas de la misma.

**Palabras clave:** Enfermedad renal poliquística; enfermedad renal crónica; patrón autosómico dominante; patrón autosómico recesivo.

**ABSTRACT**

The Polycystic Kidney Disease (PKD) is a genetic disease which is characterized by the gradual emergence of cystic lesions in the kidneys, which replace the renal parenchyma causing deterioration of its function to stage 5. The PKD is one of the causes of Chronic Kidney Disease on renal replacement therapy (RRT). The Polycystic Kidney Disease has two patterns of inheritance: autosomal dominant pattern and the autosomal recessive pattern. The dominant form is more common but less severe than autosomal recessive form. PKD is known that is caused by mutations in several loci of the human genome. The autosomal dominant form can be caused by mutations in two different genes (PKD1 and PKD2), unlike the autosomal recessive form only has a causal gene (PKHD1). At present the international scientific community efforts toward deeper understanding of the pathophysiology of this entity for the purpose of developing therapeutic alternatives that avoid the appearance of cysts or progression of those already in place. The aim is to systematize the available scientific knowledge about Polycystic Kidney Disease and provide a source of consultation update on clinical characteristics and therapeutic options for patients with PKD.

**Keywords:** Polycystic kidney disease, chronic kidney disease, autosomal dominant, autosomal recessive pattern.

### Introducción

La enfermedad renal poliquística es conocida por sus siglas en inglés como PKD (*Polycystic Kidney Disease*) y se caracteriza por el desarrollo de quistes epiteliales en ambos riñones, los que van aumentando progresivamente en tamaño y en número, hasta desplazar el parénquima, con la consecuente aparición de la falla funcional. Es una enfermedad de origen genético, multisistémica, de inicio tardío en la forma autosómica dominante y de inicio temprano si es recesiva.

La PKD se produce por mutaciones en varios loci humanos. La forma autosómica dominante la causan mutaciones en dos genes diferentes: PKD1 y PKD2. El 85 % de los individuos con enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD) tiene mutaciones en el gen PKD1, mientras que el 15 % restante posee mutaciones en el gen PKD2.

Las principales características patogénicas son el aumento de la proliferación celular tubular y la formación de los quistes a lo largo de la nefrona.<sup>1</sup> Estos pacientes suelen presentar además, quistes en otros órganos como el hígado, cerebro y páncreas.<sup>2</sup>

La PKD muestra una considerable prevalencia a nivel mundial<sup>3</sup> y es la causa del 10 % de los pacientes que padecen enfermedad renal crónica en estadio 5, condición ésta que requiere de terapia sustitutiva renal, con los elevados costos que implica, por lo cual resulta de gran interés para la comunidad científica, la profilaxis de la PKD, así como hallar alternativas de tratamiento para los afectados, especialmente terapias que retrasen la aparición y el desarrollo de los quistes renales, como un modo de proteger el parénquima, mejorar la calidad de vida de los enfermos, y disminuir el impacto económico y social de la terapia sustitutiva renal, que en el Ecuador alcanzó en el año 2013, un total de 8 253 pacientes

<sup>1</sup> Especialista de I grado en Medicina Interna. Médico Tratante de la Unidad Renal Dialibarra Cia. Ltda. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador.

<sup>2</sup> Licenciada en Enfermería. MSc. en Docencia Educativa e Investigación Universitaria. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador.

<sup>3</sup> Licenciada en Terapia Física. MSc. en Gerencia de la Salud. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador.

<sup>4</sup> Licenciada en Enfermería. MSc. en Salud Familiar. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador.

**Autor de correspondencia:** Pedro Cena Rivero. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Ecuador.

con este tratamiento.<sup>4</sup> Si calculamos que aproximadamente el 10 % los pacientes con Enfermedad Renal Crónica (ERC) ha llegado la Terapia Sustitutiva Renal (TSR) como consecuencia de la PKD, tendríamos que su número asciende aproximadamente a 825 individuos. Tan sólo en la ciudad de Ibarra, 252 pacientes recibían TRS en el año 2013.<sup>4</sup>

## Enfermedad Renal Poliquística Autosómica Dominante

### Prevalencia

La Enfermedad Renal Poliquística autosómica dominante, en inglés *Autosomal Dominant-PKD* (ADPKD) es la enfermedad renal hereditaria más frecuente. Se ha descrito que su prevalencia, alcanza 1/800 en todos los grupos étnicos y afecta 1/500-1/1000 recién nacidos vivos.<sup>6</sup> Aproximadamente 2700 personas con ADPKD iniciaron terapia de reemplazo renal en el 2008 en los Estados Unidos de América, las que se añadieron a las 26.000 personas que ya recibían dicha terapia por causa de esta enfermedad.<sup>7</sup>

Si bien la ADPKD es una importante causa de enfermedad renal crónica en el adulto, la misma ha ganado importancia en Pediatría desde que se describieron los primeros casos en niños. Su diagnóstico prenatal en determinados casos, ya es posible desde hace más de 20 años. El reporte más temprano es a las 16 semanas de gestación. Se estima que aproximadamente el 2 % de los niños afectados se presentan con manifestaciones graves.

La inesperada aparición infantil de la enfermedad en una familia con antecedentes de inicio clásico en adultos, no tiene una explicación satisfactoria a pesar de que se reporta cierta variabilidad en su expresión familiar.<sup>8</sup> Zerres y otros, estudiaron 64 familias con 79 niños afectados y diagnosticaron cinco casos prenatalmente en 17 familias con más de un hijo con la enfermedad.<sup>11</sup> Se ha señalado que aproximadamente en el 30 % de las personas en riesgo, el diagnóstico puede establecerse por ultrasonografía antes de los 10 años de edad,<sup>18</sup> aunque en el 40 % de los afectados no ha sido posible detectar quistes antes de los 30 años de edad.<sup>9</sup>

### Fisiopatología

La ADPKD se caracteriza por el desarrollo de lesiones quísticas renales que afectan el funcionamiento de la nefrona, cuya primera manifestación clínica es la hipostenuria (pérdida de la capacidad de concentrar orina); posteriormente se reduce el flujo sanguíneo renal que desencadena en una pérdida progresiva del parénquima, que va siendo reemplazado progresivamente por lesiones quísticas. Esto lleva a la aparición de complicaciones propias del daño renal como son la hipertensión arterial y la anemia. Asimismo, aumenta el riesgo de infecciones urinarias a repetición y la aparición de dolor en el dorso y los flancos como manifestación del aumento de tamaño quístico, su infección o sangrado interno.

La evolución progresiva de las lesiones renales conduce a la ERC grado 5, que a los 70 años de edad ya padece el 70 % de los afectados por ADPKD. En estos pacientes se observa además, la aparición de quistes en otros órganos, como el hígado, las vesículas seminales, el páncreas y la membrana aracnoides, así como alteraciones vasculares, dígase aneurismas intracraneales, dilatación del arco aórtico, disección de la aorta torácica, prolapso de la válvula mitral y hernias en la pared abdominal.<sup>10</sup>

Las manifestaciones clínicas están directamente relacionadas con el tamaño de los quistes y con el grado de afectación del parénquima. El volumen de los quistes aumenta de manera exponencial. Según estudios realizados, se conoce que el incremento de volumen en estos quistes es alrededor del 5,3 % al año.<sup>11</sup> Como antes se expuso, la ADPKD puede ser causada por mutaciones en dos genes diferentes; la más frecuente es la ADPKD1 (85 % de los casos) que es causada por mutaciones en el gen PKD1 o también llamado policistina1. Este gen codifica la síntesis de una proteína del mismo nombre; la proteína policistina 1 que es una glicoproteína transmembrana, reguladora de canales calcio y de la homeostasis del calcio intracelular. También cumple un papel muy importante en la interacción célula-célula y célula-matriz.<sup>12</sup> El 15 % de los pacientes restantes se deben a mutaciones en el gen PKD2, que codifica la proteína policistina 2, una proteína transmembrana que actúa como canal de calcio voltaje dependiente y

regula el calcio intracelular, especialmente en el retículo endoplásmico. Esta proteína está implicada en el movimiento ciliar de las células epiteliales donde se expresa fenotípicamente.

### Evolución de la enfermedad

Un estudio realizado por el Consorcio de Estudios Imageológicos para valorar la progresión en la PKD (CRISP) realizó un seguimiento prospectivo a 214 individuos afectados, con imágenes anuales, y mostró que el volumen total renal y el volumen de los quistes aumentan de forma exponencial. El promedio del volumen renal total fue de 1060±642 ml de línea de base, y se encontró que el incremento anuales de 204±246 ml por año (5,27±3,92% año), durante un periodo de seguimiento de 3 años.<sup>13,3</sup>

La función renal de los pacientes con ADPKD se mantiene conservada hasta aproximadamente los 40 años de edad, a expensas de una hipertrofia compensatoria en las nefronas funcionantes.<sup>14</sup> Pero la enfermedad continúa su progresión y alrededor de los 50 años ya se encuentra algún grado alteración en la tasa de filtración glomerular (TFG), la cual va disminuyendo con el transcurso del tiempo hasta llegar a un valor por debajo de 15 ml/min (ERC estadio 5).<sup>15</sup> Los riñones pueden alcanzar un gran tamaño, aproximadamente 25 libras en una mujer de 1,55 m. Se considera que el 50 % de los individuos con ADPKD desarrollará ERC estadio 5 para a los 60 años. La edad de presentación de la falla renal es más temprana en PKD1 que en PKD2 (54 vs.74 años),<sup>3</sup> sin embargo, la edad de inicio de la falla renal es variable, incluso dentro de la misma familia. Se ha determinado, que la ADPKD1 es más severa que la ADPKD2, ya que presenta un mayor aumento del tamaño renal, así como un mayor número de quistes. Se ha demostrado que la tasa de crecimiento de los quistes es similar para los dos tipos.<sup>16</sup>

El fenómeno de expresividad variable se pone de manifiesto con la aparición, en una misma familia, de casos graves y casos leves. La variabilidad fenotípica involucra diferencias en la tasa de filtración glomerular, la edad a la que se alcanzó la falla renal terminal, la ocurrencia de hipertensión arterial, la presencia de quistes extrarrenales sintomáticos y la hemorragia subaracnoidea por aneurismas intracraneales en frambuesas.<sup>17</sup> Aunque esta es una enfermedad autosómica dominante, entre el 10 y el 20 % de los pacientes no tiene historia familiar previa, se trata de mutaciones *de novo* o posiblemente un infra diagnóstico de los familiares afectados.<sup>18</sup>

### Diagnóstico

El diagnóstico se establece inicialmente mediante estudios imagenológicos como ecografía renal o tomografía axial computarizada (TAC). Para el diagnóstico de la enfermedad poliquística se necesita la presencia de 3 a 5 quistes en cada riñón (**figura**).<sup>19</sup> La sospecha clínica se basa en los hallazgos específicos en función de la edad. La ecografía renal es el método más usado por su bajo costo y fácil disponibilidad, el cual reporta riñones aumentados de tamaño y de contornos irregulares con múltiples quistes, aunque sólo detectan quistes mayores a 8 mm y se debe tener en cuenta que en individuos jóvenes o con PKD2, es posible que el informe ecográfico no los reporte y pasen inadvertidos.<sup>20,21</sup>

Se han realizado estudios para determinar la sensibilidad y especificidad de la ultrasonografía en el diagnóstico de la ADPKD tipos 1 y 2, comparado con el análisis de ligamiento. La sensibilidad de la ecografía renal para el diagnóstico fue comparada con los resultados de los genotipos inferidos por los estudios de ligamiento. La sensibilidad de la ecografía renal para diagnosticar la ADPKD, en menores a 30 años, fue del 95 % para ADPKD tipo1 pero sólo del 67 % para ADPKD tipo 2. Sin embargo, la sensibilidad de la ecografía, tanto para ADPKD tipo1 como tipo 2, es del 100 %.<sup>22,23</sup>

### Tratamiento

El tratamiento se encamina a controlar las manifestaciones secundarias y a evitar el deterioro de la función renal por las comorbilidades asociadas, en particular el control de la Hipertensión Arterial, para lo cual se usan inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II), ya que han mostrado reducción en la microalbuminuria en individuos con PKD, efecto que no se ha encontrado con los bloqueadores de canales de Calcio. Se

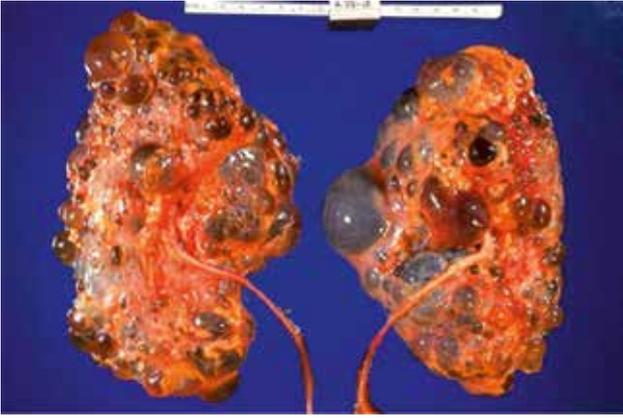


Fig. Riñones poliquísticos.

ha demostrado que la tensión arterial media debe ser menor a 92 mm Hg, ya que una mayor tensión arterial está relacionada con mayor mortalidad.<sup>24</sup>

Para el manejo del dolor, en primer lugar, se debe descartar infección, la presencia de litiasis o de tumor. Una vez descartadas se pondrá en práctica el tratamiento escalonado para el dolor, con la precaución de evitar o reducir a dosis mínimas, la medicación nefrotóxica. En determinados casos de difícil alivio se ha recomendado el uso de antidepressivos tricíclicos, los que han mostrado buenos resultados.<sup>3</sup> Los agentes narcóticos se reservan para las crisis agudas, ya que su uso crónico produce dependencia física y psicológica. Cuando las medidas anteriores para el manejo del dolor crónico no han tenido éxito, se puede realizar bloqueo neural, aspiración del quiste o terapia esclerosante.<sup>9,25,29</sup> Existen otras terapias quirúrgicas para el manejo del dolor, que van desde descompresión quirúrgica, penetración laparoscópica, denervación renal, hasta la nefrectomía.

Dentro de las medidas específicas para la nefroprotección, es importante recalcar las recomendaciones propias del paciente con Enfermedad Renal Crónica en sus diferentes estadios, como la indicación de una dieta con restricción de proteínas (a 0,6 g proteína/kg peso corporal/día), así como promover la ingesta hídrica mínima de 2000 ml/día.<sup>26</sup>

#### Asesoría genética

La mayoría de los individuos afectados con PKD autosómica dominante tiene, por lo menos, un familiar afectado. La incidencia de mutaciones *de novo* es significativa y ocurre en cerca del 10 % de las familias afectadas. Las recomendaciones para la evaluación de los familiares de un probando afectado, con una aparente mutación *de novo*, incluye un tamizaje adecuado por métodos imagenológicos, especialmente en PKD2.<sup>28</sup> Se debe señalar que la historia familiar puede parecer negativa, por falla en el diagnóstico, muerte temprana del individuo afectado antes del inicio de los síntomas, o inicio tardío de la enfermedad en el familiar afectado. En el caso del hermano de un afectado, el riesgo varía así:

- Si alguno de los padres está afectado, el riesgo en cada uno de sus hijos es del 50 %.
- Si ninguno de los padres tiene alteraciones en las imágenes renales, ni tampoco en el examen molecular, lo más probable es que se deba a una mutación *de novo*; por lo tanto, el riesgo que la enfermedad se repita en otros hijos es similar al de la población general.<sup>28</sup>

#### Consideraciones en la asesoría del trasplante renal

Es importante realizar una valoración muy estricta a los familiares de un paciente con ADPKD, ya que estos pueden también tener la enfermedad y aún no manifestarla. En este caso, se contraindica la donación del riñón.<sup>3</sup> La evaluación para descartar la enfermedad tiene que ser molecular e imagenológica. Usualmente los pacientes con PKD ingresan a lista para donantes cadavéricos.<sup>30</sup>

#### Terapias bajo investigación

Los estudios realizados tanto en el modelo animal como en humanos con ADPKD indican que los quistes son responsables del declive en la tasa de filtración glomerular, que ocurre de manera tardía en el curso de la enfermedad.<sup>31</sup> Esto se debe a la disrupción anatómica en la filtración glomerular y los mecanismos de concentración urinaria a escala masiva, asociados a la compresión y obstrucción de las nefronas adyacentes, por los quistes en la corteza, médula y papila. Los quistes dificultan el drenaje de orina, lo cual conduce a la atrofia tubular y pérdida de la función del parénquima renal, por mecanismos similares a la obstrucción ureteral. Estos producen citosinas y factores de crecimiento que resultan en fibrosis y falla renal.

Por lo tanto, es una estrategia razonable el prevenir o disminuir la progresión de formación de quistes, para evitar los cambios secundarios y así prolongar la función renal en estos pacientes.<sup>31</sup> Se ha comprobado que la proteína *mammalian target of rapamycin* (mTOR) está activada de manera aberrante en el epitelio quístico de los pacientes con ADPKD.<sup>7</sup> Por tal motivo, se han realizado estudios clínicos en humanos, para comprobar si medicamentos inhibidores de la mTOR, como el Sirolimus, presentan eficacia en detener la progresión de la enfermedad.<sup>18,31</sup>

El Sirolimus es un macrólido, que actualmente se usa como inmunosupresor en la prevención del rechazo de trasplante renal. Este medicamento fue descubierto inicialmente como un producto de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Su efecto inmunosupresor se basa en que inhibe la respuesta a la interleucina 2 (IL-2), bloqueando la activación de los linfocitos B y T. El Sirolimus se une a una proteína citoplasmática llamada FKBP12 y forma el complejo Sirolimus/FKBP12, el cual inhibe la vía del mTOR. Este complejo mTOR también es llamado FRAPo RAFT y juega un importante papel en el crecimiento y proliferación celular.<sup>11,33</sup>

El Sirolimus ha mostrado beneficios significativos en el modelo murino para PKD y ha reducido la progresión de la enfermedad.<sup>19</sup> Un estudio aleatorizado, controlado, con 18 meses de ingesta de Sirolimus en adultos con ADPKD y enfermedad renal crónica temprana no encontró evidencia de que el Sirolimus a dosis de 2 mg/día, enlenteciera el crecimiento renal poliquístico, comparado con el grupo control.<sup>17</sup>

En cuanto a otros inhibidores de la vía mTOR, tenemos al Everolimus, con el cual se realizó un ensayo aleatorizado, doble ciego, con 433 pacientes con ADPKD, que recibieron durante 2 años Everolimus a dosis de 2,5 mg dos veces al día vs. placebo en el grupo control. Los resultados de este estudio muestran que el Everolimus disminuyó el incremento en el volumen renal total de los pacientes con ADPKD, durante el primer año; pero no disminuyó la progresión del daño renal. Sin embargo el uso de Everolimus estuvo asociado a una elevada tasa de efectos adversos, similar a las encontradas en trasplante renal.<sup>34</sup>

Existen reportes de familias con ADPKD, que no presentan mutaciones en PKD1 ni en PKD2, por lo que se presume la existencia de otro gen relacionado (PKD3), aunque ello todavía no ha sido demostrado.<sup>2</sup>

Un mejor conocimiento de la fisiopatología y la disponibilidad de modelos animales han permitido el desarrollo de otros fármacos prometedores para ensayos clínicos.

#### Antagonistas de vasopresina

Estudios recientes en modelos animales han demostrado que la regulación de los niveles de AMPc por vía de los receptores V2 puede inhibir drásticamente el desarrollo de quistes renales.<sup>45,46</sup>

El consumo de una cantidad elevada de agua también ejerce un efecto protector por sí solo, en el desarrollo de poliquistosis renal en ratas; probablemente esto se debe a la inhibición de la secreción de vasopresina. Recientemente, se han completado estudios clínicos en fase II con tolvaptan (antagonista con alta potencia y selectividad para el receptor de vasopresina V2 humano) y un estudio en fase III se encuentra en marcha.<sup>47</sup>

#### Análogos de la somatostatina

La somatostatina actúa sobre los receptores SST2 e inhibe la acumulación de AMPc no sólo en el riñón sino también en el

hígado. La octreotida, un análogo sintético de la somatostatina, ha demostrado causar un enlentecimiento en el aumento de tamaño de quistes renales y hepáticos en modelos animales de PQR y en riñones poliquísticos. (p) Tres recientes estudios prospectivos aleatorizados con control y octreotida o lanreotida durante 6 a 12 meses mostraron una reducción en el volumen hepático en pacientes con PQH y buena tolerancia.<sup>47,48</sup>

Otras estrategias dirigidas contra los mecanismos moleculares que se encuentran alterados en la PKD han demostrado tener resultados prometedores en modelos animales, pero aún no han sido probados en estudios clínicos. Dichos fármacos incluyen: activadores del canal de calcio de la PC2 (triptolide), metformina, agonistas del receptor gamma activado por el proliferador peroxisómico, inhibidores o antagonistas de los transportadores y canales requeridos para la secreción de cloruro (inhibidores de CFTR), e inhibidores de la síntesis de glucosilceramida.

Otros fármacos que han sido efectivos en ensayos preclínicos y que muestran posible utilidad para el tratamiento de la PQR en humanos incluyen inhibidores de Erb-B1 (receptor de factor de crecimiento epidérmico) y Erb-B2, Src, MEK, y quinasas dependientes de ciclinas.

## Enfermedad renal poliquística autosómica recesiva

El enfermedad poliquística autosómica recesiva (ARPKD) es una forma frecuentemente grave de PKD que afecta los riñones y las vías biliares. Se ha estimado una incidencia de 1:20.000 nacidos vivos.<sup>38</sup> Todas las formas típicas de ARPKD resultan de mutaciones en el gen, PKHD1. Este gen está localizado en el cromosoma 6p21.1-p12.<sup>37,38</sup>

### Diagnóstico

El diagnóstico puede ser realizado en el periodo intrauterino, neonatal o en los primeros meses de vida, por medio de una ecografía renal que evidencie un aumento difuso del volumen renal bilateral. El oligohidramnios es un hallazgo común, y debido al bajo gasto urinario fetal, puede desarrollar la secuencia de Potter (hipoplasia pulmonar, fascies típicas y anomalías en extremidades).<sup>39</sup>

Además del riñón, también se encuentra compromiso hepático con hepatomegalia, incremento de la ecogenicidad y dilatación de los ductos biliares intrahepáticos. Aunque la fibrosis hepática está histológicamente presente desde el nacimiento, los hallazgos clínicos, radiológicos y de laboratorio pueden estar ausentes al momento del diagnóstico.<sup>4</sup>

Como presentación inicial, el 45 % de los pacientes debutan con anomalías hepáticas, y por otra parte, debido a la hipoplasia pulmonar, hasta un 30 % de los neonatos afectados fallece a causa de insuficiencia respiratoria,<sup>39</sup> antes de que se haya arribado al diagnóstico de ARPKD, con el consecuente subregistro.<sup>2</sup>

La patología revela un compromiso renal simétrico y bilateral. Histológicamente, los riñones muestran un patrón de dilataciones fusiformes (microquistes menores a 4 mm de diámetro) radiados desde la médula hacia la corteza.<sup>40</sup> Estudios de microdissección y localización tubular han demostrado que la enfermedad está confinada a los túbulos colectores en todos los niños afectados; una fase quística transitoria ocurre en los túbulos proximales fetales.<sup>41</sup>

Los casos menos graves presentan riñones palpables bilaterales, hipertensión arterial, hipostenuria, acidosis metabólica y falla renal progresiva. En cuanto al deterioro hepático, este puede resultar asintomático o progresara hipertensión portal.<sup>37</sup>

Los casos menos graves presentan riñones palpables bilaterales, hipertensión arterial, hipostenuria, acidosis metabólica y falla renal progresiva. En cuanto al deterioro hepático, este puede resultar asintomático o progresara hipertensión portal.<sup>38</sup>

### Tratamiento

Los neonatos con cuadros graves, requieren medidas de soporte vital por lo que es indispensable determinar el grado de afectación pulmonar y la evaluación de la función respiratoria, saturación de oxígeno, radiografía de tórax y exámenes paraclínicos pertinentes según el caso. Adicionalmente, se debe realizar ecografía renal, medición de la presión arterial, transaminasas, bilirrubinas séricas, albumina

sérica, tiempos de coagulación y hemograma. Si se presenta oliguria o anuria, se debe iniciar diálisis peritoneal en los primeros días de vida. Si los riñones presentan un tamaño aumentado, algunos autores recomiendan nefrectomía unilateral o bilateral según el compromiso del paciente y la afectación de los órganos adyacentes involucrados.<sup>40</sup>

El manejo de la hipertensión arterial asociada se realiza con IECAs o ARA II. Las infecciones urinarias recurrentes son una complicación frecuente en este tipo de pacientes, por lo que se debe vigilar estrechamente su aparición, así como la presencia de nefrolitiasis asociada. Se debe evitar la administración de medicamentos simpaticomiméticos, agentes nefrotóxicos, AINEs, aminoglucósidos, caféina, teofilina y bloqueadores de canales de calcio. En cuanto a la sobrevida de los pacientes, la tasa anual es del 71-75% a los 10 años y del 66% a los 15 años.<sup>41</sup>

### Asesoría genética

Como ya se ha mencionado, esta patología se transmite por un mecanismo de herencia autosómico recesivo. En principio, los padres de un menor afectado son portadores obligados; tienen un riesgo del 25 % en cada embarazo de transmitir los alelos afectados y que nazca un afectado nuevamente.

### Padres de un niño afectado

Los padres de un niño afectado son heterocigotos obligados (cada uno de ellos porta un alelo mutante). La probabilidad de tener otro hijo afectado es del 25 % en cada embarazo; la probabilidad de tener un hijo portador de un alelo mutado es del 50 % y la probabilidad que no porte ningún alelo mutado es del 25 %.

Los heterocigotos son asintomáticos, aunque es importante realizar ecografía renal en padres de niños con sospecha de ARPKD, para excluir la posibilidad de ADPKD. No existen datos sistemáticos disponibles de la sensibilidad y especificidad de la ecografía prenatal en el diagnóstico de ARPKD. Desde el punto de vista radiológico, los riñones quísticos y brillantes, cuando se detectan incidentalmente en una ecografía prenatal de rutina, son un dilema diagnóstico, ya que pueden ser producidos por diversas etiologías, con numerosas implicaciones para el pronóstico fetal y futuros embarazos.<sup>42</sup>

Si no existe historia familiar de ARPKD, pero en la ecografía prenatal se evidencian riñones quísticos y aumentados de tamaño, se recomienda realizar ecografía fetal de detalle y cariotipo para evaluar la presencia de anomalías cromosómicas u otras anomalías congénitas en el feto.<sup>42</sup>

La prueba molecular se puede realizar con el análisis de ADN de células fetales, por amniocentesis (entre la semana 15 y 18 de gestación) o a la semana 12 de gestación por biopsia de vellosidad coriónica.<sup>42</sup> El diagnóstico genético pre implantacional está disponible para familias en las que se ha identificado la mutación causal de la enfermedad.<sup>41</sup>

### Hijos de un afectado con ARPKD

Los hijos de un individuo afectado con ARPKD son todos heterocigotos obligados (portadores) de una mutación causante de la enfermedad. La frecuencia de portadores en la población general es de 1:70; por lo tanto, el riesgo que uno de sus hijos presente la enfermedad, depende de si su pareja es portador(a) de la mutación. Teniendo en cuenta la frecuencia de portadores en la población general, el riesgo sería del 0,7 %.<sup>43</sup>

### Detección de portadores

Se realiza una vez se detecte la mutación en el probando. Si aún no se conoce la mutación en la familia, se realiza un análisis de ligamiento. Se debe hacer hincapié en que el momento ideal para determinar el riesgo genético, determinación del estatus de portador y la realización del test prenatal debe ser antes del embarazo,<sup>28</sup> en cuanto al pronóstico de los pacientes.<sup>44</sup>

### Conclusiones

La Enfermedad Renal Poliquística es la enfermedad renal de origen genético más importante, y tiene dos patrones de transmisión hereditaria: la autosómica dominante y la autosómica recesiva, siendo la más grave la forma autosómica recesiva. Constituye una de las causas más significativas de ERC grado 5 bajo terapia sustitutiva renal.

Existe gran variabilidad en la expresión fenotípica de esta enfermedad, la cual no sólo depende de los *loci* afectados sino de otros factores desconocidos. La terapéutica actual se encamina hacia el control de los síntomas y en evitar la pérdida del parénquima renal mediante el control de las enfermedades y factores de riesgos asociados, fundamentalmente la hipertensión arterial.

La prevención de la enfermedad está basada en la asesoría genética. Actualmente existen numerosos ensayos clínicos prometedores, con fármacos que persiguen detener el desarrollo de los quistes en el riñón y de este modo conseguir la conservación del parénquima.

## Referencias bibliográficas

- Adeola T, Adeleye O, Potts JL et al. Thoracic aortic dissection in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Natl Med Assoc.* 2001; 93:282-7.
- Durán Álvarez Sandalio. Enfermedad renal poliquística autosómica dominante. *Rev Cubana Pediatr [revista en la Internet].* 2007 Sep [citado 2014 Abr 14]; 79(3). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312007000300010&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312007000300010&lng=es).
- Guatibonza Y; et al. Actualidad de la Enfermedad Renal Poliquística. Univ. Méd. Bogotá (Colombia). 2013; 54 (1): 53-68.
- Sociedad Ecuatoriana de Nefrología. Reporte 2013. Reporte 2013. Recolección de datos. [citado 2014 feb 12] <http://sociedadecuatorianadenefrologia.org/wp-content/uploads/2014/05/editorial-revsen.pdf>
- Stengel B, Billon S, van Dijk PC. Trends in the incidence of renal replacement therapy for end stage renal disease in Europe, 1990-1999. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:1824-33.
- Wilson P. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2004;350:151-64.
- Durán S. et al. Enfermedad Renal Poliquística Autosómica Dominante. *Revista Cubana de Pediatría.* 2007; 79 (3)
- Coto E, Aguado S, Álvarez J, Menéndez Díaz MJ, López Larrea C. Genetic and clinical studies in autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *J Med Genet.* 1992; 29: 243-246.
- Stengel B, Billon S, van Dijk PC. Trends in the incidence of renal replacement therapy for end stage renal disease in Europe, 1990-1999. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:1824-33.
- Wilson P. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2004; 350:151-64.
- Schrier RW. Optimal care of autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Nephrology Carlton.* 2006; 11:124-30.
- Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:5466-71.
- Klahr S, Breyer JA, Beck GJ, et al. Dietary protein restriction, blood pressure control, and the progression of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5:2037-47.
- US Renal Data System. US RDS 2010. Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease and end stage renal disease in the United States [internet]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2010.
- Rodríguez R. Retardo en la progresión del daño renal en pacientes con insuficiencia renal crónica estado 4: impacto de un programa de prevención en prediálisis. *Asocolnef.* 2007;1:10-21.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Inter. Suppl.* 2013;3:1-150.
- Park EY WY. Polycystic kidney disease and therapeutic approaches. *BMB Reports.* 2011 Jun;44:359-68.
- Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, et al. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2006;354:2122-30.
- Harris PC, Rossetti S. Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6:197-206.
- Harris PC, Rossetti S. Determinants of renal disease variability in ADPKD. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17:131-9.
- Handa SP. Cardiovascular manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease in young adults. *Clin Invest Med.* 2006;29:339-46.
- Seeman DJ. Ambulatory blood pressure correlates with renal volume and number of renal cysts in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Blood Press Monit.* 2000;8:107-10.
- Grantham JJ. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2008;359:1477-85.
- Hateboer N, DijkMAV, Bogdanova N, et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *Lancet.* 1999;353:103-7.
- Lieske JC, Toback FG. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1993;3:1442-49.
- Serra A L, Poster D, Kistler A D, et al. Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2010;363: 820-9.
- Torres V E, Harris P C, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet.* 2007;369:1287-301.
- Torres V E. Treatment strategies and clinical trial design in ADPKD. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17:190-204.
- Ravine D, Gibson RN, Walker RG, et al. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet.* 1994;343:824-7.
- Nicolau C, Torra R, Badenas C, et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2: assessment of US sensitivity for diagnosis. *Radiology.* 1999;213:273-6.
- Ecder TSR. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:194-200.
- Sarnak M. The effect of a lower target blood pressure on the progression of kidney disease: long-term follow-up of the modification of diet in renal disease study. *Ann Intern Med.* 2005;142:342-51.
- Alam A, Perrone RD. Management of ESRD in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17:164-72.
- International Advisory Board Meeting 2006: Abstracts. Nutritional therapy in patients with chronic kidney disease: protein-restricted diets supplemented with keto/ aminoacids. *Am J Nephrol.* 2006;26(Suppl.1):5-27.
- Ong AC, Devuyst O. Towards the integration of genetic knowledge into clinical practice. *Nephron Clin Pract.* 2011;118:c3-8.
- Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *Genere views.* Seattle (WA): University of Washington; 1993.
- Pei Y. Practical genetics for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2011;118:c19-30.
- Grantham J, Mulamalla S, Swenson Fields K. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7:556-66. DOI:10.1038/nrneph.2011.109.
- Beevers C. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J cancer.* 2006;119:757-64.
- Alam A, Perrone RD. Management of ESRD in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17:164-72.
- Walz G, Budde K, Mannaa M, et al. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2010;363:830-40.
- Rossetti S, Consugar M B, Chapman A B, et al. CRISP Consortium. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:2143-60.
- Zerres K, Mucher G, Becker J, et al. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet.* 1998;76:137-44.
- Torres VE. Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2405-18.
- Wang X, Wu Y, Ward CJ, et al. Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:102-8.
- Irazabal MV, Torres VE. Poliquistosis Renal Autosómica Dominante. 2011 *Revista Nefrología. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología. Nefrología Sup Ext* 2011;2(1):38-51.

Recibido: julio de 2014.

Aprobado: diciembre de 2014.

## REVISIÓN / REVIEWS

## *Mycobacterium bovis*: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria

### *Mycobacterium bovis*: realities and challenges for the veterinary biopharmaceutical industry

Aníbal Domínguez Odio<sup>1</sup>, Rafael Pérez Polanco<sup>2</sup>, Isbel González Marrero<sup>3</sup>, Raiselys Toirac Proenza<sup>4</sup>, Yanelis Riquenes Garlobo<sup>5</sup>, Yudit Rodríguez Coipel<sup>4</sup>, Isis Acosta Guevara<sup>5</sup>.

**RESUMEN**

El *Mycobacterium bovis* es el principal agente etiológico de la tuberculosis bovina, enfermedad bacteriana de distribución mundial, crónica, de fácil transmisión, debilitante, zoonótica, antropozoonótica, que afecta cualquier órgano y puede cursar asintóticamente. Sobre esta base, se realizó un estudio con el objetivo de abordar el estado actual y las proyecciones científico-tecnológicas para la prevención y diagnóstico de la tuberculosis bovina, provocada por *M. bovis*. Se demostró que el 45,09 % de los artículos originales sobre inmunoprofilaxis contra bacterias, indexados en la base de datos Scopus y contextualizada hasta principios de 2014, estaban enfocadas hacia *M. bovis*. A pesar de los adelantos en biología molecular y las esperanzas depositadas en las moléculas Ag85A, Rv0287, Rv0288, Rv0251c, MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10, conjuntamente con sus combinaciones, continuará ausente en el mercado una vacuna efectiva, segura y diferenciante; así como un sistema diagnóstico DIVA robusto. Se concluye que en los próximos 5 años continuará ausente una formulación vacunal oficialmente reconocida y que la prueba de tuberculina a pesar de sus debilidades continuará siendo la principal herramienta de vigilancia.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, tuberculosis bovina, vacuna, diagnóstico.

**ABSTRACT**

*Mycobacterium bovis* is the main etiological agent of bovine tuberculosis, bacterial diseases of world distribution, chronicle, of easy transmission, debilitating, zoonotic and antropozoonotic that affects any organ and which can be presented without symptoms. On this base, it was carried out a study with the objective of approaching the current state and the scientific-technological projections for the prevention and diagnosis of the bovine tuberculosis, caused by *M. bovis*. It was demonstrated that the 45.09% of the original articles on immunoprophylaxis against bacteria, registered in the Scopus database and contextualised until principles of 2014, were focused toward *M. bovis*. In spite of the advances in molecular biology and the hopes deposited in the Ag85A, Rv0287, Rv0288, Rv0251c, MPB70, MPB83, ESAT-6 and CFP-10 molecules, jointly with their combinations, it will continue absent in the market an effective, safety and differentiating vaccine; as well as a robust DIVA diagnosis system. It can be concluded that in the next 5 years, an officially recognized vacinal formulation will continue absent and that the tuberculin test in spite of its weaknesses will continue being the main tool of surveillance.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, vaccines, diagnosis:

## Introducción

Dentro de las enfermedades infectocontagiosas que se vigila constantemente y de las que se exige su notificación obligatoria una vez confirmada su presencia, se encuentra la tuberculosis bovina (TBb). Esta enfermedad es provocada con mucha frecuencia por *Mycobacterium bovis*, perteneciente a la familia Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*. Dicha bacteria, a pesar de ser un patógeno primario para los bovinos, tiene un rango excepcionalmente amplio de hospederos vertebrados, entre los cuales se incluyen animales de interés económico (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, aves), afectivos, silvestres y los seres humanos.<sup>1-3</sup>

El interés mundial en el control y erradicación de la TBb se justifica tradicionalmente no solo por el deterioro cuantitativo

y cualitativo de los principales indicadores productivos y reproductivos que provoca en esta especie, sino además por los incrementos en los costos de producción que genera su diagnóstico, las pérdidas económicas debido al sacrificio sanitario aplicado para su control; su transmisibilidad hacia los humanos; y por las persistentes e inmediatas restricciones comerciales que se les aplican a las producciones ganaderas procedentes de los países afectados.<sup>4,5</sup>

Las negativas consecuencias productivas-sanitarias-comerciales que se derivan del diagnóstico de la enfermedad, unido a lo extremadamente costoso de los tratamientos antimicrobianos y el incremento del riesgo de aparición de cepas resistentes que esta práctica genera, son incentivos suficientes para favorecer la búsqueda de una protección preventiva, efectiva y segura contra la TBb,

<sup>1</sup> Maestro en Ciencias. Investigador auxiliar. Especialista de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias. Especialista de la Empresa Productora de Vacunas y Bacterianas. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Directora de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Maestro en Ciencia. Especialista de Investigación y Desarrollo del Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

<sup>5</sup> Especialista de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

**Autor de correspondencia:** Aníbal Domínguez Odio. Maestro en Ciencias. Investigador auxiliar. Especialista de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba. E-mail: anibal.dominguez@labiofam.co.cu

pero además de un diagnóstico diferencial *ante mortem* entre animales infectados y vacunados. Sobre esta base se pretende abordar el estado actual y las proyecciones científico-tecnológicas para la prevención y diagnóstico de la TBb, provocada por *M. bovis*.

### Tuberculosis en animales y humanos

Quizás la TBb sea un uno de los mejores ejemplos que pueden utilizarse para demostrar la existencia de una sola salud.<sup>6</sup> Los animales y el hombre son capaces de transmitirse la enfermedad entre sí (zoonosis y antropozoonosis), ser susceptibles de padecerla, tener similares vías de contagio, evolución clínica y lesiones histopatológicas. De igual manera su agente etiológico si bien constituye un linaje filogenético independiente, comparte no solo el 99,95 % de sus genes con *M. tuberculosis*, sino además un origen común, la extremada habilidad para sobrevivir dentro del organismo hospedero, factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.<sup>4,7-9</sup>

Sin embargo, a pesar de haber transcurrido muchos años de investigación de ambos lados, la TBb continúa y continuará siendo un problema para muchos países sean desarrollados o no. Lo anterior demuestra en primer lugar, la necesidad urgente de analizar la enfermedad desde un enfoque integral, donde la mayor fortaleza radique en la estrecha coordinación entre los servicios de sanidad animal y salud pública. Y en segundo lugar, incrementar el arsenal tecnológico para combatir la enfermedad, a la vez que se entienda mejor su epidemiología.

Los obstáculos que han enfrentado las numerosas estrategias nacionales de control-erradicación, y la emergencia de la enfermedad a nivel global, están asociados a la convergencia de varios

hechos que la condicionan y complejizan. Una revisión de la literatura especializada publicada en los últimos años, permite identificar entre los más relevantes los cambios genómicos frecuentes de esta micobacteria. La variedad genética detectada en *M. bovis* se debe a la presencia/ausencia de secuencias de inserción y espaciadores de secuencias repetidas de irregulares tamaños, mutaciones, entre otros. Lo anterior genera la existencia de regiones variables y esto a su vez a polimorfismos, cepas inherentes a sitios geográficos específicos (figura 1); cepas patógenas circulantes diferentes en animales de vida libre y domésticos, cruce frecuente de la barrera inter-especies, incremento de su virulencia y la aparición de resistencia a drogas antituberculosas.<sup>10-14</sup> A lo anterior se une el riesgo que representa tanto la movilización de animales entre regiones y países,<sup>15</sup> la antropización de áreas de vida silvestre, donde no existen garantías sanitarias<sup>16</sup> y el reemplazo de animales nativos resistentes a la enfermedad por otros más productivos pero más susceptibles.<sup>17</sup>

En el ámbito veterinario, la TBb es reportada oficialmente por muchos países a nivel mundial (figura 1), siendo su prevalencia más elevada en África y ciertas partes de Asia y América.<sup>16,18</sup> En este contexto es trascendental mencionar el importante papel que desempeñan los animales salvajes de vida libre en la diseminación de la enfermedad. Estos al ser hospederos de *M. bovis*, constituyen un riesgo siempre latente en la aparición de nuevos brotes en el ganado especializado y un factor muy importante a tener en cuenta para estimar el éxito o fracaso de los programas de control a largo plazo.<sup>2,19,20</sup>

Relativo a este tema llama la atención que en el continente Americano solo el 38,23 % de los países que lo conforman reportan la enfermedad en su forma clínica durante el 2014 y el 11,11 % declaran tenerla limitada en una o varias zonas, por lo general en áreas donde habitan animales silvestres (figura 2).

Estos datos deben tomarse con mucha cautela, pues lejos de demostrar avances en su erradicación, apuntan hacia una subnotificación de la enfermedad. Tal sospecha se debe a debilidades diagnósticas presentes en los países latinoamericanos y del caribe,<sup>21</sup> entre los cuales se pueden mencionar las siguientes:

1. dificultades técnicas existentes para un correcto aislamiento e identificación del agente;
2. uso limitado de pruebas de diagnósticas;
3. inspección veterinaria insuficiente en la mayoría de los mataderos;
4. falta de confianza entre granjeros y oficiales de salud;
5. registros inapropiados para los casos positivos; y
6. falta de adecuada compensación por la eliminación de animales positivos.

Situación contraria presenta la enfermedad en el ámbito de la salud humana, detectándose una re-emergencia.<sup>4,22</sup> La tuberculosis zoonótica en diferentes países del mundo sean desarrollados o no, está relacionado de forma general con una serie de factores,<sup>1, 23-26</sup> los cuales se relacionan a continuación:

1. inmigración de personas procedentes de regiones donde la TBb es frecuente;
2. aparición de cepas multiresistentes a drogas antituberculosas;
3. antropización de nuevas áreas y con ello el contacto forzoso entre humano-animal salvaje-animal doméstico;
4. inmunodepresión provocado por infección con el virus de inmunodeficiencia humana u otras enfermedades crónicas debilitantes;
5. persistencia de estilos de vida riesgosos como son: consumo de carne y leche sin pasteurizar procedentes de animales enfermos criados de forma familiar, fabricación de quesos y mantequillas artesana-

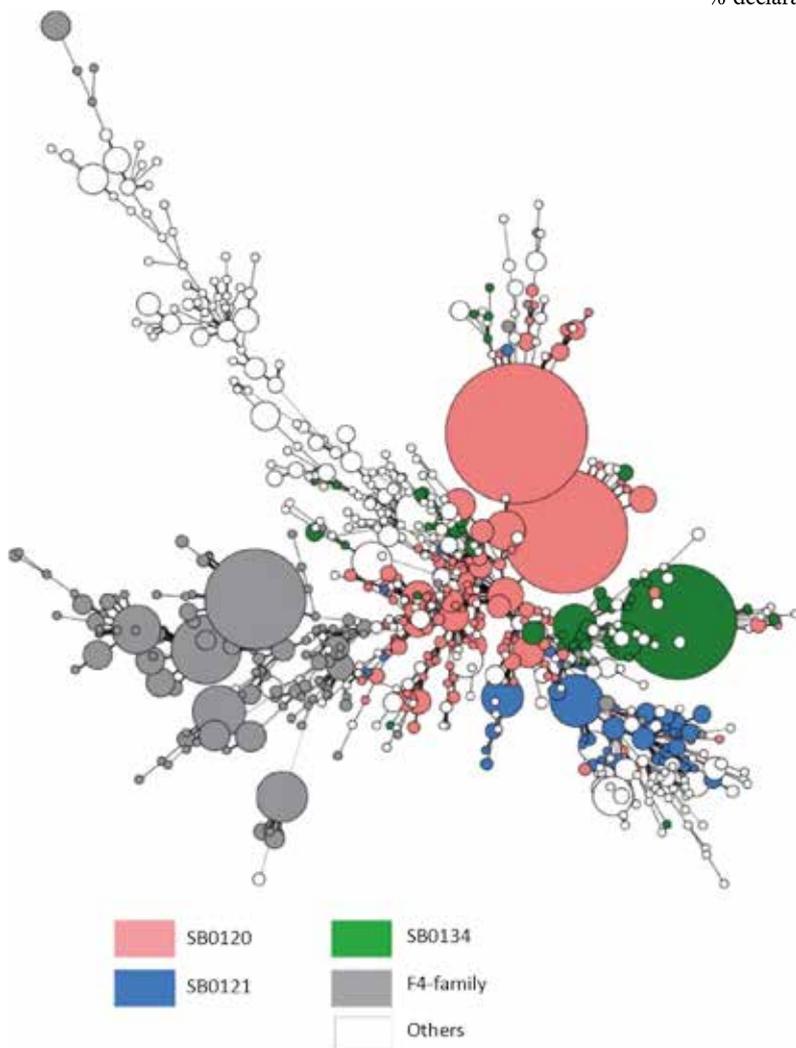


Fig. 1. Variedad de cepas de *M. bovis* detectadas en Francia durante el periodo 1978-2013.<sup>10</sup>

nales, entre otros; y desconocimiento de la enfermedad, vía de transmisión y las medidas para evitar su contagio.

Si bien es cierto que algunos países han reconocido oficialmente tener bajos niveles de incidencia de tuberculosis humana inducida por *M. bovis*, otros por el contrario notifican su incremento. La persistencia regionalizada de este agente se demuestra por ejemplo en California, Estados Unidos donde se incrementó su presencia hasta un 69,9 % en pacientes entre 15-69 años de edad.<sup>27</sup> Otros países por ejemplo China, declaran un comportamiento contrario, aunque consideran necesario mantener su identificación de forma rutinaria.<sup>28</sup> En relación a la región latinoamericana la baja prevalencia debe interpretarse con cuidado, pues existe una subnotificación y por tanto una subvaloración de la tuberculosis como enfermedad zoonótica. Esta situación se debe entre otros factores, al empleo de medios de cultivo menos apropiados para esa micobacteria y baja cobertura diagnóstica.<sup>29, 30</sup>

### Vacunación y diagnóstico veterinario

La estrategia para el control y erradicación de la tuberculosis en sentido general se ha bifurcado en dos líneas de investigación: farmacéutica o terapéutica<sup>31, 32</sup> y biológica o preventiva.<sup>33</sup> El análisis pormenorizado del flujo de información especializada sobre esta última estrategia de control, permitió conocer que el campo temático de *M. bovis* muestra un lugar relevante, en relación a otras bacterias patógenas igualmente de interés veterinario como *Brucella abortus* y *Escherichia coli*.

La búsqueda temática en la base de datos Scopus y contextualizada hasta principios de 2014, indicó que el 45,09 % de los artículos originales sobre inmunoprofilaxis contra bacterias estaban enfocadas hacia el primer agente bacteriano, mientras que el restante 29,90 % y 25,01 % se corresponden a los dos agentes antes mencionados. Sin embargo, al analizar de forma global el número de investigaciones y publicaciones sobre bovinos, se pudo demostrar que el mayor interés científico a nivel mundial se dirige hacia enfermedades virales y garrapatas,<sup>34</sup> quedando en un tercer plano las bacterias patógenas.

Es importante resaltar que no existe, para la enfermedad y para la especie bovina en particular, una formulación inmunoprofiláctica óptima, a pesar de ser una opción muy económica para su control y erradicación. No obstante, está disponible en el mercado actualmente una vacuna lograda por tecnología clásica de producción a partir de la cepa viva atenuada de *M. bovis* Bacillus de Calmette-Guérin (BCG), pero su uso no está previsto dentro de los programas de control en muchos países afectados por la enfermedad, considerándose incluso ilegal en otros.<sup>35</sup> La restricción sanitaria de uso de esta vacuna se debe a su controver-

sial eficacia, y a su interferencia con la prueba de tuberculina.<sup>36-38</sup>

A pesar de esta limitación, se han vacunado con BCG especies salvajes de vida libre que conviven en áreas comunes con los bovinos, estrategia que en principio es similar a la empleada para el control y erradicación de otras enfermedades de etiología viral, como la rabia.<sup>39</sup> Las experiencias con BCG en animales salvajes, demostraron que con independencia de la vía de administración (intramuscular y oral), se puede lograr inducir respuestas protectoras que limitan la distribución y la gravedad de la enfermedad.<sup>40, 41</sup>

El ambiente regulatorio adverso, contrario a lo que pudiera pensarse no ha limitado los esfuerzos para lograr una vacuna preventiva contra TBb. Tal insistencia esta apoyada en varios pilares: relación costo-beneficio favorable al productor pecuario, alto nivel de impacto por el número de especies a proteger, y disminución del riesgo de aparición de cepas resistentes.<sup>5</sup> Para aspirar a construir desde el presente un ambiente futuro de cambio y vencer prohibiciones sanitarias, las nuevas generaciones de vacunas deben tener en teoría a criterio del autor y otros investigadores de referencia como Conlan *et al.*, 2015,<sup>42</sup> las siguientes características generales: viable económicamente, segura a corto y largo plazo, formulación estable, inducir protección diferenciante, rápida y duradera, preferiblemente de por vida; generar protección clínica completa, eliminar o reducir la transmisibilidad del agente, y no interferir con los medios diagnósticos de pesquiasaje masivos.

Una gran parte de la literatura consultada demuestra que ha ocurrido un incremento significativo del conocimiento de la biología molecular del *M. bovis* y que este se ha vinculado con el desarrollo tecnológico. Esta convergencia está contribuyendo a identificar las cepas de mayor prevalencia por región geográfica,<sup>10, 11</sup> lograr una vacuna que permita inmunizar animales domésticos y salvajes por igual, cortar la cadena de transmisión y fortalecer los programas de erradicación y control [43, 44]. En tal sentido, se están transitando por algunos caminos que pueden lograrlo o al menos en parte, una de ellos es atenuando cepas mediante genes eliminados, ya sean únicos como MbΔp27-p55 o dobles como MbΔmce2A/MbΔmce2B y MbΔphoP-phoR/MbΔmce2. Dichas cepas si bien resultaron ser más atenuadas que la BCG, mostraron diferencias en cuanto a eficacia en modelos animales, siendo las de doble deleción las candidatas más prometedoras.<sup>45-47</sup>

Otra vertiente existente en la estrategia de vacunación es mejorar la protección conferida por la vacuna BCG. Como resultado de esto se han ensayado en el organismo diana variantes de esquemas de inmunización, consistente en combinar bajas dosis de BCG por vía oral y filtrado proteico de *M. bovis* formulada con o sin quitina y gel 01, por vía intranasal. Los resultados demostraron que la co-administración independientemente de la vía de administración no confería protección a terneros.<sup>48</sup>



Fig. 2. Distribución mundial de la tuberculosis bovina durante el 2014.

La utilización de vectores virales recombinantes que expresan proteínas de la micobacteria, como Ag85A, Rv0287, Rv0288 y Rv0251c, formuladas con o sin adyuvantes, es otra de las variantes utilizadas. Los resultados obtenidos en modelos animales si bien son prometedores,<sup>49, 50</sup> aún le queda mucho camino que recorrer, siendo uno de los requisitos regulatorios de obligatorio cumplimiento la demostración de la estabilidad de la construcción génica y, la no reversión de la virulencia.

Sin embargo, parece ser que las mayores oportunidades de éxito en la inducción de respuesta vacunal efectiva y diferenciante (tecnología DIVA) están asociadas con la utilización combinada de proteínas recombinantes o cócteles de péptidos inmunogénicos sintéticos. A raíz de esto merece especial atención los antígenos Rv3875, Rv3874, Rv1986, Rv3872, Rv3878 y Rv3615c, siendo estos detectados solo en bovinos infectados naturalmente por *M. bovis* y ausentes animales vacunados con BCG [33], aunque se requiere profundizar en su eficacia.

Esta muy claro para todos los involucrados en el tema *M. bovis* y TBb, que el logro de una vacuna efectiva, segura y diferenciante por tecnología DIVA, será muy ventajosa desde el punto de vista productivo, económico, sanitario y social debido a las siguientes razones:

- reducirá el número de animales que deben ser sacrificados de forma emergente por sospechas de padecer la enfermedad, y con ello el desperdicio de proteínas de origen animal;
- facilitará la pesquisa masiva detectando de forma rápida y di-

ferencial la aparición de brotes;

- acortará el periodo necesario para demostrar la ausencia de la infección y el éxito de los programas de control;
- acortará el periodo de eliminación de las barreras comerciales ocasionadas por la notificación de la TBb, evitando así la pérdida de los mercados y
- contribuirá a que los países en desarrollo alcancen la tan necesaria seguridad alimentaria.

En relación al diagnóstico de la TBb, la tabla muestra la diversidad de métodos directos e indirectos de diagnóstico que existen en la actualidad, conjuntamente con sus fortalezas y debilidades.<sup>51-54</sup> Esta aparente diversidad de métodos, no impide el hecho de que aún no se dispone de la prueba ideal para el diagnóstico de esta enfermedad. Mientras se encuentra la solución definitiva, se reconoce el aislamiento del agente como uno de los procedimientos para el diagnóstico definitivo de la enfermedad y la prueba de hipersensibilidad retardada (tuberculina) como el método de referencia no solo para la detección de la tuberculosis bovina de rutina en campo, sino en estudios comparativos con otros métodos de diagnósticos presentes y futuros.

**Tabla.** Caracterización general de algunas pruebas diagnósticas disponibles para pesquiasaje y confirmación de TBb inducida por *M. bovis*

**Tabla.** Caracterización general de algunas pruebas diagnósticas disponibles para pesquiasaje y confirmación de TBb inducida por *M. bovis*.

	Diagnóstico	Ventajas	Limitaciones	
Métodos directos	Clínico	Realización diaria Pesquisaje masivo	Discriminación limitada por escasos signos clínicos	
	Bacteriológico	Define el agente etiológico	Resultados demorados Condiciones especiales Demorado	
	Histopatológica	Confirmatoria	Condiciones especiales Uso <i>post mortem</i>	
	Tinción Ziehl-Neelsen	Económica	Confirma el agente etiológico	No distingue entre especie
		Rápida Uso <i>ante mortem</i>	Rápida	Condiciones especiales
	Métodos indirectos	Tuberculina	Económica	No diferencia entre vacunados e infectados
Fácil aplicación y lectura			No detecta infección reciente	
Resultados en poco tiempo			Reacciones cruzadas	
ELISA		Pesquisaje masivo	Solo detecta inmunidad celular	
		Experiencia de uso	Sensibilidad y especificidad irregulares	
		Uso <i>ante mortem</i>	No se puede repetir hasta después de 60 días Doble manipulación del ganado	
PCR	Pesquisaje masivo	Baja sensibilidad		
	Resultados en poco tiempo	Condiciones especiales		
	Uso <i>ante mortem</i>	Costo elevado		
	Uso en animales salvajes			
	Se puede repetir la prueba			
	Confirma el agente etiológico	Condiciones especiales		
Diferencia micobacterias	Costo elevado			
Resultados en poco tiempo	No uso de rutina			
Poca cantidad de muestras				
Uso en animales salvajes				
Uso <i>ante mortem</i>				
Se puede repetir la prueba				
Detecta infección temprana	Condiciones especiales			
Poca cantidad de muestras	Costo elevado			
Uso en animales salvajes	Transporte rápido de muestra			
Uso <i>ante mortem</i>	No uso de rutina			
Se puede repetir la prueba				

Esta debilidad si bien es cierto que probablemente continúe por algún tiempo más, no significa que la comunidad científica se de por vencida para corregirla. Los esfuerzos se han separado en tres vertientes no excluyentes entre sí, la primera encaminada a demostrar la conveniencia del uso combinado de pruebas diagnósticas;<sup>55, 56</sup> la segunda dirigida a potencializar las actuales pruebas con nuevas moléculas<sup>57, 58</sup> y la tercera orientada hacia el diagnóstico diferencial entre vacunados e infectados.<sup>59</sup>

Las dos últimas vertientes tienen en común la necesidad de buscar y caracterizar nuevos candidatos antigénicos expresados o secretados por *M. bovis*<sup>60-63</sup> e intentarlos producir de forma eficiente.<sup>64</sup> En consecuencia se han formulado y ensayados en cobayos proteínas recombinantes purificadas, péptidos sintéticos independientes o en cocteles de antígenos. Las moléculas antigénicas y de captura de mayor interés son: MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 las cuales requirieron estudios más profundos de validación de desempeño, demostrado las potencialidades prácticas de mezclas de antígenos para el diagnóstico DIVA futuro, basado en pruebas de sensibilidad dérmica.<sup>56, 60-62</sup>

El análisis retrospectivo y detallado de los artículos relacionados con *M. bovis* publicados en Scopus, y contextualizados hasta principios de 2014 permitió apreciar que no existe y probablemente no exista en los próximos 5 años en el mercado una vacuna eficaz contra la tuberculosis bovina, a pesar de que su desarrollo es una prioridad global. Por otro lado la prueba de tuberculina, independientemente de sus debilidades continuará siendo la principal herramienta de vigilancia en los próximos 5 años para la TBb.

## Agradecimientos

A Omaidía María Medina Alamo, especialista de la Dirección de Investigación y Desarrollo, perteneciente al Grupo Empresarial LABIOFAM, por sus respectivos aportes a este trabajo.

## Referencias bibliográficas

1. Ramdas KE, Lyashchenko KP, Greenwald R, Austerman S, McManis C, Waters WR. *Mycobacterium bovis* infection in humans and cats in same household, Texas, USA, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3): 480-3.
2. Musoke J, Hlokwé T, Marcotty T, du Plessis BJ, Michel AL. Spillover of *Mycobacterium bovis* from wildlife to livestock, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3):448-51.
3. Buddle BM, de Lisle GW, Griffin J, Hutchings SA. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *N Z Vet J*. 2015;1-9.
4. Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laise C. Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(6): 899-908.
5. Hawn TR, Day TA, Scriba TJ, Hatherill M, Hanekom WA, Evans TG, et al. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014; 78(4):650-71.
6. Travis DA, Sriramarao P, Cardona C, Steer CJ, Kennedy S, Sreevatsan S, et al. One Medicine One Science: a framework for exploring challenges at the intersection of animals, humans, and the environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1334:26-44.
7. Galloway M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3): 435-43.
8. Mittal M, Chakravarti S, Sharma V, Sanjeeth BS, Churamani CP, Kanwar NS. Evidence of presence of *Mycobacterium tuberculosis* in bovine tissue samples by multiplex PCR: possible relevance to reverse zoonosis. *Transbound Emerg Dis*. 2014; 61(2):97-104.
9. Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, et al. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci*. 2014; 97 Suppl: S78-85.
10. Hauer A, De Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, et al. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One*. 2015; 10(2):e0117103.
11. Navarro Y, Romero B, Copano MF, Bouza E, Domínguez L, de Juan L, et al. Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by *M. bovis* in cattle. *Vet Microbiol*. 2015; 175(1):99-104.
12. Shimizu E, Macías A, Paolicchi F, Magnano G, Zapata L, Fernández A, et al. Genotyping *Mycobacterium bovis* from cattle in the Central Pampas of Argentina: temporal and regional trends. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(2):236-45.
13. Ramos DF, Tavares L, da Silva PE, Dellagostin OA. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. *Braz J Microbiol*. 2014; 45(2):365-72.
14. Hlokwé TM, van Helden P, Michel AL. Evidence of increasing intra and inter-species transmission of *Mycobacterium bovis* in South Africa: are we losing the battle?. *Prev Vet Med*. 2014; 115(1-2):10-7.
15. Tsao K, Robbe-Austerman S, Miller RS, Portacci K, Grear DA, Webb C. Sources of bovine tuberculosis in the United States. *Infect Genet Evol*. 2014; 28:137-43.
16. Sanou A, Tarnagda Z, Kanyala E, Zingué D, Nouctara M, Ganamé Z, et al. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(10):e3142.
17. Richardson IW, Bradley DG, Higgins IM, More SJ, McClure J, Berry DP. Variance components for susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy and beef cattle. *Genet Sel Evol*. 2014; 46(1):77-81.
18. Je S, Yeo UC, Song T, Kim KC, Park SY, Kim MJ, et al. Extent of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle herds subject to partial culling as determined by an interferon-gamma assay. *J Vet Sci*. 2014; 15(2):259-65.
19. Livingstone PG, Hancox N, Nugent G, Mackereth G, Hutchings SA. Development of the New Zealand strategy for local eradication of tuberculosis from wildlife and livestock. *N Z Vet J*. 2015; 2:1-10.
20. Ciliberti A, Gavier-Widén D, Yon L, Hutchings MR, Artois M. Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: Expert-based risk analysis focus on ruminants. *Prev Vet Med*. 2015; 118(4):271-84.
21. Proaño PF, Benítez OW, Portaels F, Rigouts L, Linden A. Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(3): 279-86.
22. Cordova E, Gonzalo X, Boschi A, Lossa M, Robles M, Poggi S. Human *Mycobacterium bovis* infection in Buenos Aires: epidemiology, microbiology and clinical presentation. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012; 16(3):415-7.
23. Negin J, Abimbola S, Marais BJ. Tuberculosis among older adults - time to take notice. *Int J Infect Dis*. 2015; 32:135-7.
24. Khyatti M, Trimbilas RD, Zouheir Y, Benani A, El Messaoudi MD, Hemminki K. Infectious diseases in North Africa and North African immigrants to Europe. *Eur J Public Health*. 2014; 24 Suppl 1:47-56.
25. Moiane I, Machado A, Santos N, Nhambir A, Inlamea O, Hattendorf J, et al. Prevalence of bovine tuberculosis and risk factor assessment in cattle in rural livestock areas of Govuro District in the Southeast of Mozambique. *PLoS One*. 2014; 9(3):e91527.
26. García DJ, Coelho AC. Evaluación del conocimiento de los ganaderos sobre la tuberculosis bovina e implicaciones para su control. *Rev. Mex. Cienc. Pecu*. 2014; 5(2):213-229.
27. Galloway M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3):435-443.
28. Jiang G, Wang G, Chen S, Yu X, Wang X, Zhao L, et al. Pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in China. *Sci Rep*. 2015; 5:8538.
29. Fonseca SL, Silva DR, Betzler de Oliveira VG, Gomes da Silva M, Boechat N, et al. Identification of *Mycobacterium bovis* among mycobacterial isolates from human clinical specimens at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2011; 37(5):664-68.
30. Rivas C, Greif G, Coitinho C, Araújo L, Laserra P, Robello C. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*: una zoonosis reemergente en Uruguay. *Rev. Méd. Urug*. 2012; 28(3): 209-214.
31. Mdluli K, Kaneko T, Upton A. Tuberculosis drug discovery and emerging targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1323:56-75.
32. Ibeke NN, Nvau JB, Oladosu PO, Usman AM, Ibrahim K, Boshoff HI, et al. Some Nigerian anti-tuberculosis ethnomedicines: a preliminary efficacy assessment. *J Ethnopharmacol*. 2014; 155(1):524-32.
33. Waters WR, Palmer MV, Buddle BM, Vordermeier HM. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*. 2012; 30(16):2611-22.

34. Domínguez A, Pérez R, Cossío G, Morejón Y, Riquenes Y. Current trends and perspectives in veterinary vaccine production. *Biotechnol Apl.* 2014; 31(3): 196-203.
35. Villarreal RB, Berg S, Chamberlain L, McShane H, Hewinson R, Clifford D, et al. Development of a BCG challenge model for the testing of vaccine candidates against tuberculosis in cattle. *Vaccine.* 2014; 32(43):5645-9.
36. Parlane NA, Shu D, Subharat S, Wedlock DN, Rehm B, de Lisle G, et al. Revaccination of cattle with bacille Calmette-Guérin two years after first vaccination when immunity has waned, boosted protection against challenge with *Mycobacterium bovis*. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106519.
37. Ameni G, Vordermeier M, Aseffa A, Young D, Hewinson R. Field Evaluation of the Efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against Bovine Tuberculosis in Neonatal Calves in Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 1533-1538
38. Whelan AO, Coad M, Upadhyay B, Clifford D, Hewinson R. Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitisation and protective immunity in cattle. *Vaccine.* 2011; 29: 5453-5458.
39. Mähl P, Cliquet F, Guiot AL, Niin E, Fournials E, Saint JN, et al. Twenty year experience of the oral rabies vaccine SAG2 in wildlife: a global review. *Vet Res.* 2014; 45(1):77-84.
40. Gormley E, Corner LA. Control strategies for wildlife tuberculosis in Ireland. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60(Suppl 1): 128-35.
41. Tompkins DM, Buddle BM, Whitford J, Cross ML, Yates GF, Lambeth MR, et al. Sustained protection against tuberculosis conferred to a wild-life host by single dose oral vaccination. *Vaccine.* 2013; 31(6):893-9
42. Conlan AJ, Brooks Pollock E, McKinley TJ, Mitchell AP, Jones GJ, et al. Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis. *PLoS Comput Biol.* 2015; 11(2):e1004038.
43. Buddle BM, Parlane NA, Wedlock DN, Heiser A. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60(Supl 1):136-46.
44. Majlessi L, Prados R, Casadevall A, Brosch R. Release of mycobacterial antigens. *Immunol Rev.* 2015; 264(1):25-45.
45. Bianco VM, Clark S, Blanco FC, Garbaccio S, García E, Cataldi A, et al. Assessment of *Mycobacterium bovis* deleted in p27-p55 virulence operon as candidate vaccine against tuberculosis in animal Models. Published online. 2014; 21. doi: 10.1155.
46. García E, Bianco MV, Gravisaco MJ, Rocha RV, Blanco FC, Bigi F. Evaluation of *Mycobacterium bovis* double knockout mce2-phoP as candidate vaccine against bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 2015; 95(2):186-9.
47. Blanco FC, Bianco MV, Garbaccio S, Meikle V, Gravisaco MJ, Montenegro V, et al. *Mycobacterium bovis*  $\Delta$ mce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent *M. bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2013; 93(3):363-72.
48. Wedlock DN, Aldwell FE, Vordermeier HM, Hewinson RG, Buddle BM. Protection against bovine tuberculosis induced by oral vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG is not enhanced by co-administration of mycobacterial protein vaccines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144(3-4):220-7.
49. Dean G, Clifford D, Gilbert S, McShane H, Hewinson RG, Vordermeier HM, et al. Effect of dose and route of immunisation on the immune response induced in cattle by heterologous Bacille Calmette-Guerin priming and recombinant adenoviral vector boosting. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 158(3-4):208-13.
50. Dean G, Whelan A, Clifford D, Salguero FJ, Xing Z, Gilbert S, et al. comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization by BCG-priming and boosting with adenovirus or protein based vaccines. *Vaccine.* 2014; 32(11):1304-10.
51. Seva J, Sanes JM, Ramis G, Mas A, Quereda JJ, Villarreal RB, et al. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 2014; 171(1-2):139-46.
52. Sales ML, Fonseca AA, Orzil L, Alencar AP, Hodon MA, Issa MA, et al. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genet Mol Res.* 2014; 13(2):4607-16.
53. Je S, Yeo UC, Song T, Kim KC, Park SY, Kim MJ, et al. Extent of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle herds subject to partial culling as determined by an interferon-gamma assay. *J Vet Sci.* 2014;15(2):259-65.
54. Waters WR, Buddle BM, Vordemeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker JP, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin.Vaccine Immunol.* 2011; 11:1882-1888.
55. Casal C, Diez GA, Álvarez J, Rodríguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, et al. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol.* 2014; 170(3-4): 342-51.
56. Carvalho RC, Furlanetto LV, Maruyama FH, Araújo CP, Barros SL, Ramos CA, et al. Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in post-mortem macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. *Meat Sci.* 2015; 106:11-15.
57. Casal C, Bezos J, Diez G A, Alvarez J, Romero B, de Juan L, et al. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-gamma assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 2012; 105:149-154.
58. Jones GJ, Whelan A, Clifford D, Coad M, Vordermeier HM. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19: 620-22.
59. Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon E, McNair J, Hewinson G, et al. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J. Clin. Microb.* 2010; 48(9):3176-3181.
60. Jones GJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17(9):1344.
61. Vordermeier M S. V. Gordon SV, Hewinson RG. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet. Microbiol.* 2011; 151: 8-13.
62. Lamont EA, Janagama HK, Ribeiro LJ, Vulchanova L, Seth M, Yang M, et al. Circulating *Mycobacterium bovis* peptides and host response proteins as biomarkers for unambiguous detection of subclinical infection. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(2):536-43.
63. Marassi CD, Zarden C, Oelemann W, Lilenbaum W. Detection of specific antibodies in cows after injection of PPD. *Pesq. Vet. Bras.* 2014; 34(3):241-243.
64. Marassi CD, Medeiros L, McNair J, Lilenbaum W. Use of recombinant proteins MPB70 or MPB83 as capture antigens in ELISAs to confirm bovine tuberculosis infections in Brazil. *Acta Tropica.* 2011; 118:101-104.

**Recibido:** enero de 2015.

**Aprobado:** febrero de 2015.

## From the laboratory to the industry: enzymatic production and applications of shortchain fructooligosaccharides (fos). Recent advances and current perspectives

Del laboratorio a la industria: producción y aplicaciones de fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) enzimática. Avances recientes y perspectivas actuales

LE. Trujillo, VE. Marcillo, R. Avalos, LK. Ponce, Thelvia I. Ramos

### ABSTRACT

The production of high yields of oligosaccharides of specific chain length from simple raw materials such as inulin and sucrose is a technical challenge so, the industrial production of short-chain fructooligosaccharides (FOS) is attracting the attention of researchers and business man due to the pharmaceutical importance of these compounds. FOS produced by the action of specific enzymes so called fructosyltransferases are 1-kestose (GF2), nystose (GF3) and fructofuranosyl nystose (GF4). GF3 and GF4 are prebiotics with biofunctional properties and hence health benefits if consumed in recommended dosages. This paper discuss recent research trends in the production and application of short-chain oligosaccharides and propose some process design to obtain these products industrially; also health benefits associated with prebiotics consumption are discussed.

**Keywords:** enzymatic production; oligosaccharides; enzymes.

### RESUMEN

La producción de altos rendimientos de oligosacáridos de longitud de cadena específica a partir de materias primas simples, tales como la inulina y la sacarosa es un desafío técnico así, la producción industrial de fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) está atrayendo la atención de los investigadores y hombre de negocios debido a la importancia farmacéutica de estos compuestos. FOS producido por la acción de enzimas específicas denominadas transferasas fructosilo son 1-questosa (GF2), nistosa (GF3) y nistosa fructofuranosil (GF4). GF3 y GF4 son prebióticos con propiedades biofuncionales y por lo tanto producen beneficios a la salud si se consumen en las dosis recomendadas. En este trabajo se discuten las tendencias recientes de investigación en la producción y aplicación de los oligosacáridos de cadena corta y se propone un diseño del proceso para obtener estos productos industrialmente. Se discuten los beneficios para la salud asociados al consumo de prebióticos.

**Palabras clave:** producción enzimática, oligosacáridos, enzimas.

### Introduction

The industrial production of short-chain fructooligosaccharides (FOS) and inulooligosaccharides is expanding rapidly due to the pharmaceutical importance of these compounds. FOS, concisely termed prebiotics, have biofunctional properties and hence health benefits if consumed in recommended dosages. <sup>1</sup> Prebiotics can be produced enzymatically from sucrose elongation or via enzymatic hydrolysis of inulin by exoinulinases and endoinulinases acting alone or synergistically. Fructosyltransferases act by cleaving a sucrose molecule and then transferring the liberated fructose molecule to an acceptor molecule such as sucrose or another oligosaccharide to elongate the short-chain fructooligosaccharide. <sup>2</sup> The FOS produced by the action of fructosyltransferases are 1-kestose (GF2), nystose (GF3)

and fructofuranosyl nystose (GF4) (. FOS, particularly the trisaccharide 1-kestose, are highly demanded in the functional food market due to their dual application as prebiotics and low-calorie sweeteners. Current FOS production from sucrose using immobilized fungal fructosyltransferases is a costly process that yields limited levels of 1-kestose so, new sources of enzymes are highly desired to date. The production of high yields of oligosaccharides of specific chain length from simple raw materials such as inulin and sucrose is a technical challenge. <sup>3</sup> This report shows some possible bioprocess for short-chain oligosaccharides production and enzyme sources for the production of these prebiotics.

### Fos Production By Plants

Fructooligosaccharides are present in many plants such as *Betavulgaris L.*, *Heliantus tuberosus*, *Asparagus officinalis*, *Cichorium*

Grupo de Biotecnología Industrial. Departamento de Ciencias de la Vida. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Ecuador.

**Autor de correspondencia:** LE. Trujillo. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Grupo de Biotecnología Industrial. Departamento de Ciencias de la Vida. Correo electrónico: luis211063@gmail.com, letrujillo3@espe.edu.ec

*intybus*, Agave Veracruz, as a carbohydrate reserve however, FOS production using vegetable sources is scarce, being most used the chicory ( *Cichorium intybus*, Figura 1 A) Flowers B) Roots), and yacon (*Polymnia sonchifolia*, Figura 2) juice.<sup>4,5</sup> On the other hand, microbial FTase can be present intra or extracellular, according to the culture conditions, in higher amounts and easier to extract than enzymes produced by plants. These advantages had made of the microorganism, the most used FTase source for in industrial FOS production by sucrose biotransformation.<sup>3</sup>

### Industrial Sucrose Biotransformation to Fos By Microbials Cells Or Enzymes

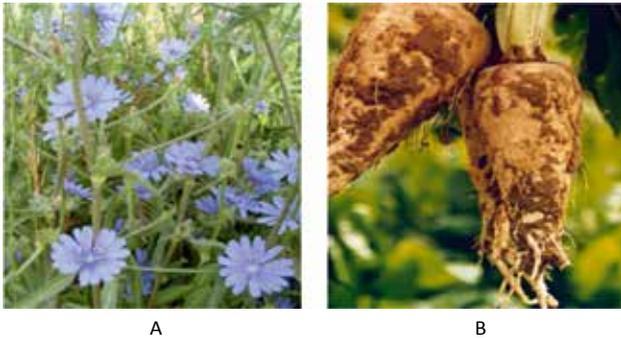


Fig. 1. Chicory flowers and roots.

FOS production can be carried out in two stages. The first one involves the enzyme production (FTase), where the carbon and nitrogen sources, pH and the presence of micronutrients, and some other additives play an important role in the enzyme production yield. In the second stage, FOS are produced using the FTase from whole cells, crude extracts or purified enzyme, through batch or continuous (immobilized cells or enzyme) processes ( Figura 3).<sup>2,6,7</sup>

### Fos Applications, Market And Perspective



Fig. 2. Yacon flowers and roots.

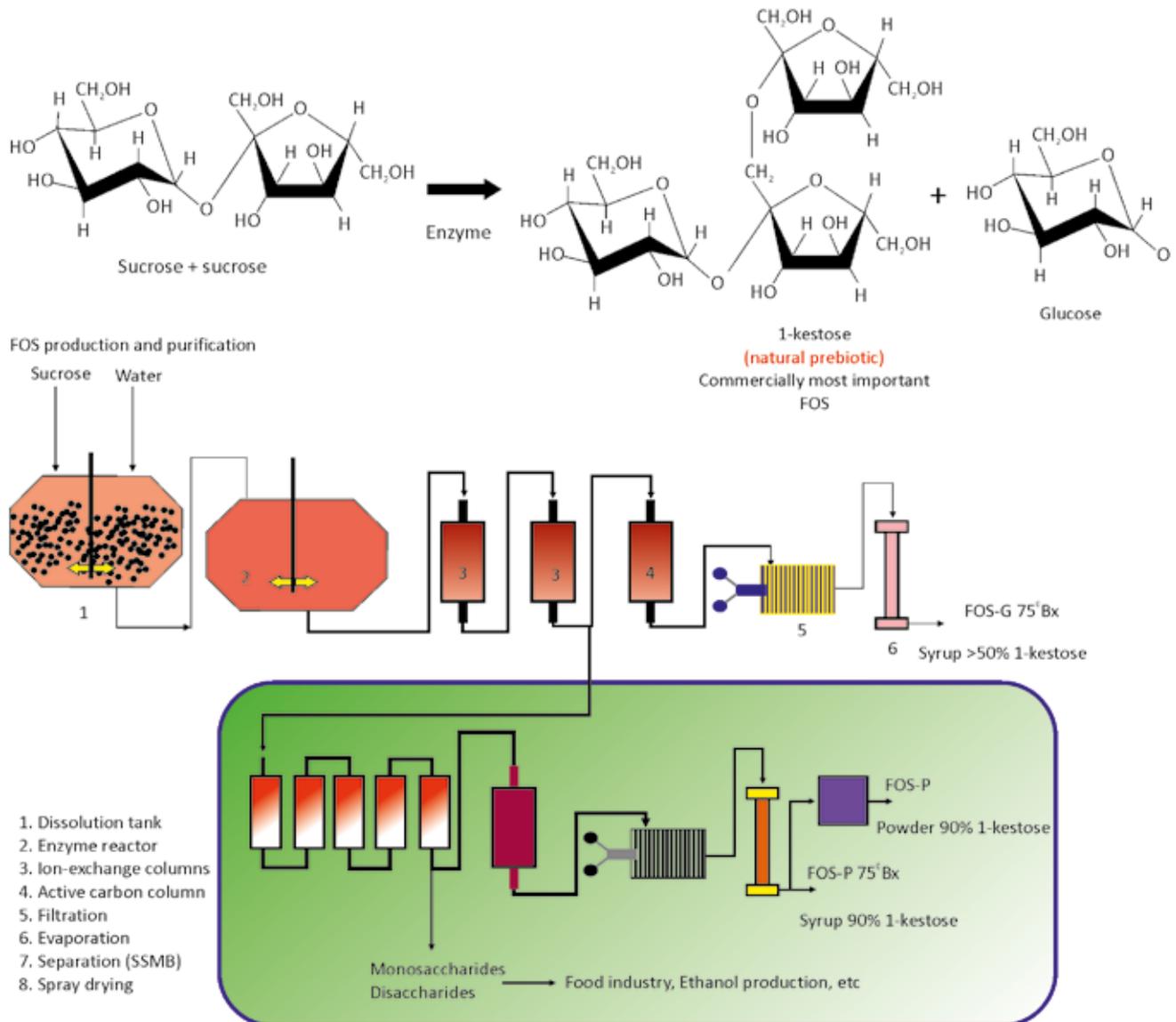


Fig. 3. Two General Bioprocess for Enzyme and FOS production from sucrose.

FOS are mainly used as an additive in functional foods. They are considered as prebiotic compounds due to their capacity to selectively stimulate the growth and/or activity of potentially health-enhancing intestinal bacteria (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains). FOS has been found to fit well within the concept of dietary fiber, because they resist digestion and absorption in the stomach and small intestine of humans and animals, and affect the intestinal epithelium that may strengthen mucosal protection and reduce the risk of gastrointestinal diseases.<sup>8</sup> The chronic ingestion of FOS has been associated with increased intestinal calcium and magnesium absorption, modification of lipid metabolism, and prevention of colon cancer. In food industry FOS are used as ingredients that contribute to enhance shelf life and taste profile.<sup>9,10</sup> The global market of functional foods is estimated up to US\$ 33 billion. In US the prebiotics market have earned revenues of US\$ 68.9 million in 2007 and will be estimates to reach US\$ 198.3 million in 2014. Although in Europe the FOS market is smaller than in US, it has shown a rate growth between 10 and 20 % during the last five years, compared to a rate growth of 2 % of the whole food market. Europe prebiotic market is estimated in US\$1.2 billions and this will be around US\$ 1.9 billions for the year 2010. UK, Germany, and France represent the main markets for FOS-containing products commercialization, with the 63 % of the whole European market ( Figura 4).



Fig. 4. FOS containing dairy products.

## Prebiotic (promotes intestinal health)

- Improves intestinal flora (*Bifidobacterialactobacilli pathogens*)
- Prevents / rehabilitates from diarrhetic diseases
- Improves lipid composition in blood
- Reduces cholesterol and improves blood pressure
- Enhances calcium absorption and retention
- Modulates immune functions
- Decreases colon cancer risk and diabetes

## References

- 1 Guío F, Rodríguez, MA Alméciga-Díaz CJ and Sánchez OF. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture. Recent Trends in Fructooligosaccharides Production. 2009; 1(3): 221-230.
- 2 Yun JW. Fructooligosaccharides occurrence, preparation, and application. Enzyme Microb Tech. 1996. 19(2):107-117.
- 3 Mutanda TMP, Mokoena AO, Wilhelmi BS, Whiteley CG. (2014) Microbial enzymatic production and applications of shortchain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol. 2014; 41:893-906.
- 4 Itaya NM, Asega AF, Carvalho MAM, Figueiredo-Ribeiro RL. Hydrolase and fructosyltransferase activities implicated in the accumulation of different chain size fructans in three Asteracea species. Plant Physiol Bioch. 2007; 45:647-656.
- 5 Huitron C, Perez R, Gutierrez L, Lappe P, Petrosyan P, Villegas J, Aguilar C, Rocha-Zavalata L, Blancas A. Bioconversion of Agave tequilana fructans by exo-inulinase from indigenous *Aspergillus niger* CH-A-2010 enhances ethanol production from raw Agave tequilana juice. J Ind Microbiol Biotechnol. 2013; 40:123-132.
- 6 Yun JW, Kim DH, Uhm TB, Song SK. Production of high content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase. Biotechnol Lett. 1997; 19(9):935-938.
- 7 Yun JW, Park JP, Song JP, Lee CY, Kim JH, Song SK. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilised endoinulinase. Bioproc Biosyst Eng. 2000; 22:189-194.
- 8 Brownawell AM, Caers W, Gibson GR, Kendall CWC, Lewis KD, Ringel Y, Slavin JL. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. J Nutr. 2012; 142:962-974.
- 9 De Sousa VMC, dos Santos EF, Sgarbieri VC. The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. Food Nutr Sci; 2011; 2:133-144.
- 10 Gualtieri KA, Guembarovski RL, Oda JMM, Fiori-Lopes L, Carneiro NK, de Castro VD, Neto JS, Watanabe MAE. Inulin: therapeutic potential, prebiotic properties and immunological aspects. Food Agric Immunol. 2013; 24(1):21-31.

Recibido: septiembre de 2014.  
 Aprobado: noviembre de 2014.



El Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) es una organización de la sociedad civil ecuatoriana, legalmente aprobado como ONG, mediante Registro Oficial N° 579 del 28 de abril de 2009. Su misión es proveer el soporte científico, tecnológico y empresarial al desarrollo de la Bioeconomía ecuatoriana.

Calle Bolívar 13-118 (Of. 11) y Av. Teodoro Gómez,  
 cebaecuador@gmail.com, www.ceba.org.ec,  
 Cel. (593) 099 5797813  
 Ibarra-Ecuador

## Paraiso natural. Laguna Cuicocha

### Natural Paradise. Cuicocha lagoon

Camila Barranco

#### ABSTRACT

Santa Ana from Cotacachi city is located in the north of Ecuador. This district is famous because of creating objects using high quality leathers, but also by the Cotacachi Cayapas Ecological Reserve, inside which is Cuicocha lagoon, placed in the Cotacachi volcano crater. This lagoon is highlighted by the three volcanic rock domes that protrude at its center, forming two islets called Teodoro Wolf and Jose Maria Yerovi, and wherein you can find a variety of Flora and Fauna. This natural reserve distinguish by offer ecological recreational activities, serving as host for one of the most popular competitions in the region, swimming across lagoon Cuicocha, which already reached its tenth edition. Is a natural place that calls for meditation, relaxation, and care natural resources.

**Keywords:** Cuicocha lagoon, Cotacachi, ecological reserve.

#### RESUMEN

La ciudad de Santa Ana de Cotacachi está ubicada en la zona norte de Ecuador. Famosa por la creación de artículos utilizando pieles y por la Reserva Ecológica Cotacachi Cayapas, dentro de la que se encuentra la laguna Cuicocha, ubicada en el cráter del Volcán Cotacachi. Esta laguna destaca por contener en su centro tres domos volcánicos que conforman dos islotes llamados Teodoro Wolf y José María Yerovi, separados por el "Canal del ensueño" y en los cuales puede encontrarse variedad de Flora y Fauna. Esta reserva natural, resalta además por brindar actividades ecológicas-recreativas y por ser sede del cruce natatorio de aguas abiertas a la Laguna de Cuicocha, que ya alcanza su décima edición. Es un lugar que llama a la meditación y preservador de las riquezas naturales.

**Palabras clave:** laguna cuicocha, cotacachi, reserva ecologica

A few days ago, I first visited the Santa Ana Cotacachi city, which is located in the north of Ecuador. This city is famous because of creating objects using high quality leathers, but also by the Cotacachi Cayapas Ecological Reserve, considering the largest Canton of the Imbabura County.

Within the reserve, we can find the Cuicocha lagoon, whose name was given after the Spanish conquest and translates from Kichwa language as Kuykucha, "cuyes lagoon" or Kuychikucha, "Rainbow Lagoon".

I had heard legends about this lagoon that spoke about magical rituals, offerings to the Sun God, and currently this natural place serves as ideal setting for purification rites at the summer solstice.

It was necessary to know the site that houses both mystery and fame, and I found one of the most beautiful and welcoming places of Ecuador.

The lagoon is located to 14 km from Otavalo, and 12 km south west of Cotacachi city. It is inside the crater of Cotacachi volcano, which is the result of an explosion of thousands years ago. It has approximately 200 m of depth, 4 km of length, 3 km of width, and is located 3068 m above sea level. The lagoon peculiarity is that at its center three volcanic rock domes protrude, forming two islets separated by the "Canal Daydream", which are called Teodoro Wolf and Jose Maria Yerovi. These

islets are the result of small eruptions occurred following to the main explosion. Some time ago, these were conditioned for receive visitors, but were consumed twice for fire caused by themselves. As a consequence, currently are inaccessible and covered with lush vegetation.

Regarding the fauna, we can find a variety of species such as the montane guinea pig, the mountain rabbit, the armadillo, the Andean fox, lots of birds like doves, pigeons, hummingbirds, and ducks, among others. Flora also has variety, about more than 400 species have their lives there as cattails, sigses, bromeliads, cerote, pumamaqui, red cedar, several varieties of Orchidias, suro, etc.

The lagoon does not have any source of water rather than the melting of the top of snow covered volcano and rain.

As an additional attraction, in the place practice different activities are promoted. We could mention the trekking of 8 km in the nature trail "Campuzano Maxim Gorky"; the walks during 4.5 hours on the self-interpretation trail; and the boat tour where you can check the volcanic origin of these waters, by the presence of bubbles caused by sulfur in the base of the lagoon. The Cuicocha lagoon also serves as host for one of the most popular competitions in the region,



Cuicocha lagoon,

swimming across lagoon Cuicocha, which already reached its tenth edition. In this athletic event 4500 m in length are covered in the shortest amount of time. This year (2015) the first place was reached by Felipe Acosta (1h 3'12"), from Quito, who takes on the podium four consecutive years, followed by Xavier Nuñez from Nautico, while the ladies winner was Mishel Tixe, who was third in the over-

ll standings. It is noteworthy that the record of this competition belongs to Francisco Rivadeneria with 1h 01'00".

Personally, I found a beautiful place that calls for meditation, relaxation, and care natural resources. Certainly, the Cuicocha lagoon is a place worthy to be visited.

## Instrucciones para los Autores

Los Trabajos serán Inéditos: Una vez aprobados, no podrán someterse a la consideración de otra revista, con vistas a una publicación múltiple, sin la debida autorización del Comité Editorial de la Revista. La extensión máxima será 8 cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y 4 las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras. Los artículos se presentarán impresos (dos ejemplares). Todas las páginas se numerarán con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. Estos deben acompañarse de una versión digital (correo electrónico o CD) en lenguaje Microsoft Word, sin sangrías, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc.). Siempre se ha de adjuntar la carta del consejo científico que avala la publicación y una declaración jurada de los autores.

**Los autores.** Se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse mediante arábigos en forma exponencial. Los trabajos originales no sobrepasarán las 20 citas; las revisiones, de 25 a 50 y las comunicaciones breves e informes de casos, Tablas, modelos y anexos: Se presentarán en hojas aparte (no se intercalarán en el artículo) y en forma vertical numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto. Las tablas se ajustarán al formato de la publicación se podrán modificar si presentan dificultades técnicas.

**Figuras:** Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, salidas de computadora, otras representaciones gráficas y fórmulas no lineales, se denominarán figuras y tendrán numeración arábiga consecutiva. Se presentarán impresas en el artículo en páginas independientes y en formato digital con una resolución de 300 dpi. Todas se mencionarán en el texto. Los pies de figuras se colocarán en página aparte. El total de las figuras y tablas ascenderá a 5 para los trabajos originales y de revisión y 3 para las comunicaciones breves e informes de casos.

**Abreviaturas y siglas:** Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes. Se emplearán las de uso internacional.

**Sistema Internacional de Unidades (SI):** Todos los resultados de laboratorio clínico se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, se escribirán entre paréntesis. Ejemplo: glicemia: 5,55 mmol/L (100 mg/100 mL).

Para facilitar la elaboración de los originales, se orienta a los autores consultar los requisitos uniformes antes señalados disponibles en: [http://www.fisterra.com/recursos\\_web/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20) (figura)

Los trabajos que no se ajusten a estas instrucciones, se devolverán a los autores. Los aceptados se procesarán según las normas establecidas por el Comité Editorial. El arbitraje se realizará por pares y a doble ciego en un período no mayor de 60 días. Los autores podrán disponer de no más de 45 días para enviar el artículo con correcciones, se aceptan hasta tres reenvíos. El Consejo de Redacción se reserva el derecho de introducir modificaciones de estilo y/o acotar los textos que lo precisen, comprometiéndose a respetar el contenido original.

El Comité Editorial de la Revista se reserva todos los derechos sobre los trabajos originales publicados en esta.

### Secretaría de Redacción

Admitimos contribuciones de profesionales de otros países. Los originales deben ser remitidos según las "Instrucciones al autor". Los trabajos serán inéditos. Solicitamos y agradecemos el canje con publicaciones similares.



# DENGUE



El dengue al igual que el chikungunya es una enfermedad viral, es más antigua que el chikungunya y también se originó en África y se extendió fuera de ese continente entre los siglos XV y XIX.



## CONTAGIO

El virus del dengue se transmite a través de un mosquito que este infectado con el virus, estos mosquitos son el *Aedes aegypti* y en menor proporción el *Aedes albopictus*.

## SÍNTOMAS

- Fiebre alta - de hasta 40°
- Dolor de cabeza
- Dolor en los ojos
- Dolor en las articulaciones
- Dolores musculares
- Inflamación de los ganglios linfáticos
- Debilidad
- Náuseas
- Vómitos
- Alergia



# TIPOS DE DENGUE



## Clásico

Esta forma de dengue es benigna y no produce muertes.

Es menos frecuente (5% del total de casos clínicos), incluye los síntomas del dengue clásico, a los que se agregan manifestaciones hemorrágicas.



## Hemorrágico



CUANDO NOS JUGAMOS LA VIDA  
LA PREVENCIÓN ES LA SALIDA

Campana de lucha contra el Dengue y Chikungunya



SECRETARÍA DE SALUD



Lucha contra El Dengue y El Chikungunya |



[www.prevencionhn.wordpress.com](http://www.prevencionhn.wordpress.com)

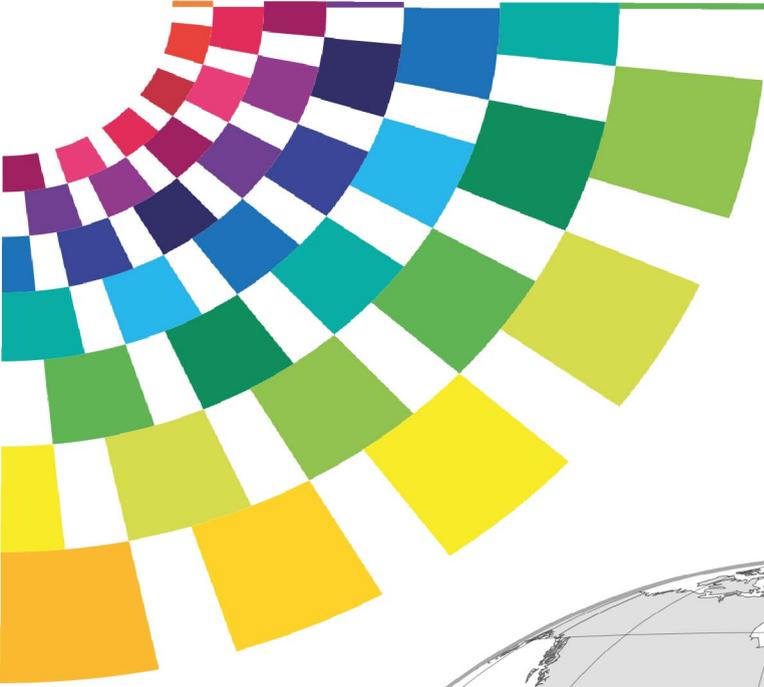


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



clinicalBiotec





Ecuador  
is ready for  
clinical trials



[clinicalbiotec.com](http://clinicalbiotec.com)